

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DES MÉCANISMES D'INHIBITION DU TRANSPORT DES
ÉLECTRONS PHOTOSYNTHÉTIQUES INDUITE PAR LES XÉNOBIOTIQUES
AFFECTANT LES RÉACTIONS PHOTOCHIMIQUES DU PHOTOSYSTÈME II

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
NADIA AIT ALI

JANVIER 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse : Les professeurs Mario Fragata, Mircea Alexandru Mateescu et Christian Blaise. Merci pour leurs remarques constructives. Je remercie également le Pr. Radovan Popovic qui a dirigé ma thèse de doctorat. Merci pour ses conseils et le support matériel de ce travail. Pour m'avoir entraînée avec dynamisme dans ses idées lumineuses et pour avoir inciter les miennes. Je tiens aussi à remercier le Pr. Philippe Juneau pour sa collaboration qui a contribué grandement à l'avancement de mon travail.

Pendant la première année de mon doctorat, j'ai eu l'occasion de travailler dans le laboratoire du groupe de recherche en écotoxicologie à l'IRB (Montréal). Mes remerciements s'adressent au D^r Pierre Yves Robidoux et au D^r Goeffrey Sunahara pour leur accueil et l'expérience enrichissante qu'ils m'ont offerts. J'adresse un remerciement tout particulier au D^r Matilde Baron (EEZ, Espagne) pour sa précieuse collaboration. L'intérêt qu'elle a porté à mon travail a été d'une aide inestimable. J'aimerais aussi remercier Mme Lucie Brodeur et les professeurs Jean-Pierre Blanchet, Dolors Planas, Anne De Vernal et Laurent Lepage pour leurs excellents encadrements pendant les cours du programme de doctorat en sciences de l'environnement.

Merci à tous mes collègues de laboratoire qui ont participé plus ou moins directement à mes travaux de recherche pendant des expériences diverses. Je retiendrai la bonne humeur et la constante disponibilité dans l'entraide : Merci à Olivier Didur, François Perreault, David Dewez, Dragan Kovacevic, Nicolas Besnier et Cyril Saison.

Enfin, mes remerciements vont à mes parents qui m'ont soutenue tout au long de mes études antérieures. Je remercie également mon conjoint qui m'a soutenue tout au long de ma thèse. Merci pour son encouragement et pour m'avoir transmis toutes ses aptitudes de persévérance et de plaisir dans l'accomplissement, importants à la réalisation de ce travail.

AVANT-PROPOS

Les études de doctorat m'ont permis de publier, dans des journaux internationaux, les résultats de mes projets de recherche sous forme de trois articles scientifiques. Ma contribution à ces projets est majeure pour les trois articles, dans lesquels je figure comme premier auteur. Cette thèse est présentée ainsi sous forme de compilation de trois articles qui seront présentés dans les chapitres suivants :

Chapitre III : Ait Ali N., Dewez D., Didur O., Popovic R. 2006. "Inhibition of photosystem II photochemistry by chromium is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex". *Photosynthesis Research*, vol. 89, p. 81-87. Dans ce travail, j'ai effectué les expériences de laboratoire. L'étudiant Olivier Didur a contribué aux analyses des données. J'ai contribué à l'interprétation des résultats et j'ai écrit les différentes versions de l'article.

Chapitre IV : Ait Ali N., Juneau P., Didur O., Perreault F., Popovic R. 2007. "Effect of dichromate on photosystem II activity in xanthophylls deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Photosynthesis Research*, vol. 95, p. 45-53. Pour ce travail, j'ai contribué à l'élaboration des idées. J'ai effectué la majorité des expériences de laboratoire. Les étudiants Olivier Didur et Francois Perreault ont contribué aux mesures de comptage cellulaire des algues. J'ai contribué à l'interprétation des résultats et j'ai écrit les différentes versions de l'article.

Chapitre V : Ait Ali N., Dewez D., Robidoux P. Y., Popovic R. 2006. "Photosynthetic parameters as indicators of trinitrotoluene (TNT) inhibitory effect: change in chlorophyll *a* fluorescence induction upon exposure of *Lactuca sativa* to TNT". *Ecotoxicology*, vol. 15, p. 437-441. Dans ce travail, j'ai contribué à l'élaboration des idées du projet, aux expériences en laboratoire et j'ai contribué à l'interprétation des résultats, ainsi qu'à l'écriture de l'article.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	iii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
RÉSUMÉ	xvii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
 CHAPITRE I	 4
INTERACTION DE XÉNOBIOTIQUES AVEC LE FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE ET INDUCTION DU STRESS OXYDATIF	 4
1.1 Les aspects structuraux et fonctionnels de l'appareil photosynthétique impliqués dans le transport des électrons photosynthétiques	 4
1.1.1 Les deux phases de la photosynthèse.....	4
1.1.2 La structure du photosystème II	7
1.1.3 Les propriétés fonctionnelles du photosystème II	12
1.1.4 Structure et fonctionnement du photosystème I	24
1.1.5 La photophosphorylation	25
1.1.6 La fixation du CO ₂ et la synthèse de glucides	27
1.1.7 La formation des espèces réactives de l'oxygène induisant un stress oxydatif	29
1.1.8 Les mécanismes impliqués dans la régulation de transport d'électrons	33
1.2 La cinétique de la fluorescence chlorophyllienne comme indicateur des réactions photochimiques et du transport des électrons photosynthétiques	 41
1.2.1 La cinétique rapide et polyphasique	43
1.2.2 Les paramètres photosynthétiques estimés par la cinétique rapide et leur signification physiologique.....	 45
1.2.3 La cinétique lente de la fluorescence chlorophyllienne.....	48
1.2.4 Les paramètres photosynthétiques de la cinétique lente de fluorescence	50

1.3. Effet des xénobiotiques sur la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique en photosynthèse.....	55
CHAPITRE II.....	58
LES PROBLÉMATIQUES ET LES OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DU PROJET DE RECHERCHE :	58
ÉTUDE DES MÉCANISMES D'INHIBITION DU TRANSPORT DES ÉLECTRONS PHOTOSYNTHÉTIQUES INDUITE PAR LES XÉNOBIOTIQUES AFFECTANT LES RÉACTIONS PHOTOCIMIQUES DU PHOTOSYSTÈME II.....	58
CHAPITRE III.....	63
INHIBITION OF PHOTOSYSTEM II PHOTOCHEMISTRY BY CHROMIUM IS CAUSED BY THE ALTERATION OF BOTH D1 PROTEIN AND OXYGEN EVOLVING COMPLEX	63
3.1 Résumé	64
3.2 Abstract.....	65
3.3 Introduction	66
3.4 Materials and methods.....	67
3.4.1 Plant growth conditions	67
3.4.2 Measurement of reactive oxygen species	67
3.4.3 Isolation of thylakoid membranes	67
3.4.4 Chlorophyll determination.....	68
3.4.5 SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis and Western Blotting	68
3.4.6 Chlorophyll α fluorescence measurements.....	68
3.4.7 Data analysis and statistics	69
3.5 Results and discussion	69
3.6 Acknowledgements	72
3.7 References	72
CHAPITRE IV	81

EFFECT OF DICHROMATE ON PHOTOSYSTEM II ACTIVITY IN XANTHOPHYLL- DEFICIENT MUTANTS OF <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	81
4.1 Résumé	82
4.2 Abstract.....	83
4.3 Introduction	84
4.4 Materials and methods.....	86
4.4.1 Algal culture	86
4.4.2 Dichromate treatment	86
4.4.3 Cell growth and chlorophyll determination	86
4.4.4 Determination of Chlorophyll <i>a</i> fluorescence parameters	87
4.4.5 Data analysis and statistic.....	88
4.5 Results and discussion	88
4.5.1 Growth inhibition and chlorophyll content.....	88
4.5.2. Effect of light intensity on PSII function and energy dissipation when algal genotypes have been exposed to dichromate toxicity effect.....	89
4.6 Acknowledgements	93
4.7 References	93
CHAPITRE V	104
PHOTOSYNTHETIC PARAMETERS AS INDICATORS OF TRINITROTOLUENE (TNT) INHIBITORY EFFECT : CHANGE IN CHLOROPHYLL <i>A</i> FLUORESCENCE INDUCTION UPON EXPOSURE OF <i>LACTUCA SATIVA</i> TO TNT	104
5.1 Résumé	105
5.2 Abstract.....	106
5.3 Introduction	107
5.4 Materials and methods.....	108
5.4.1 Soil contamination by TNT	108
5.4.2 Plant growth conditions	108
5.4.3 Chlorophyll <i>a</i> fluorescence measurement.....	109
5.4.4 Data analysis and statistics	110
5.5 Results and discussion	110

5.5.1 Effect of TNT on biomass and photosynthetic activity of <i>L. sativa</i>	110
5.6 References	112
CONCLUSION GÉNÉRALE	120
AUTRES CONTRIBUTIONS.....	126
RÉFÉRENCES	127

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : A) Structure schématique d'un chloroplaste. B) Micrographie électronique d'un chloroplaste.....	5
Figure 1.2 : Représentation schématique de la répartition des complexes pigments-protéiques dans les membranes thylacoïdales chez la plante de tabac.	7
Figure 1.3 : Modèle structurel du PSII.....	8
Figure 1.4 : Structure moléculaire de la chlorophylle <i>a</i>	13
Figure 1.5 : Spectre d'absorption des chlorophylles <i>a</i> , <i>b</i> et des caroténoïdes chez les plantes supérieures	13
Figure 1.6 : Les niveaux d'énergie dans une molécule de chlorophylle et les mécanismes de dissipation de son énergie absorbée.....	14
Figure 1.7 : Modèle du transfert aléatoire de l'énergie lumineuse absorbée par les pigments collecteurs de lumière jusqu'au centre réactionnel du photosystème II	15
Figure 1.8 : Représentation schématique des réactions photochimiques catalysées par le photosystème II.....	17
Figure 1.9 : Dégagement de l'oxygène sous l'effet d'éclairements saturants.....	18
Figure 1.10 : Modèle de la formation des états S et de la production de protons pendant la photolyse de l'eau aboutissant au dégagement d'oxygène	19
Figure 1.11 : Représentation schématique des réactions d'oxydoréduction entre les quinones A (Q_A), B (Q_B) et plastoquinone	20

Figure 1.12 : (A) Disposition des transporteurs d'électrons dans la membrane de thylacoïde. (B) Schéma présentant le potentiel redox de chaque transporteur d'électrons dans la membrane de thylacoïde	23
Figure 1.13 : Modèle structurel du photosystème I montrant l'organisation de ses différentes composantes protéiques	25
Figure 1.14 : Modèle de la structure moléculaire de l'ATP synthétase	26
Figure 1.15 : Représentation schématique d'un thylacoïde, montrant le couplage "chimio- osmotique" entre le transport membranaire des électrons et la formation du gradient de protons transmembranaire permettant la synthèse de l'ATP	27
Figure 1.16 : Schéma représentant les réactions biochimiques de la fixation du CO ₂ pendant le cycle de Calvin.....	29
Figure 1.17 : Sites de formation d'ERO pendant la photosynthèse. (A) Pendant le transport des électrons entre le PSII et PSI. (B) Détails de la formation des ERO pendant le transport d'électrons au niveau du PSI	33
Figure 1.18 : Représentation schématique des processus de photoprotection et de régulation du transport des électrons photosynthétiques lorsque les chloroplastes sont exposés à un excès d'énergie lumineuse.....	34
Figure 1.19 : Schéma de la régulation des changements d'état I et II par l'induction de la phosphorylation des LHCII par la kinase	36
Figure 1.20 : (A) Cycle des xanthophylles se déroulant chez les plantes. (B) Détails du mécanisme de la formation de la zéaxanthine à partir de la violaxanthine.....	38
Figure 1.21 : (A) Modèle de changement de la conformation des antennes collectrices de lumière du PSII, permettant la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. (B) Les mécanismes d'action de la protéine PsbS du PSII.	39

Figure 1.22 : Transport cyclique des électrons s'effectuant entre le PSI, la ferrédoxine-plastoquinone oxydoréductase et le cytochrome b_6f dans la membrane du thylacoïde.	40
Figure 1.23 : Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée.....	42
Figure 1.24 : Relation entre le transport d'électrons et l'émission de la fluorescence chlorophyllienne au niveau du PSII.....	43
Figure 1.25 : Courbe d'induction de fluorescence montrant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique.....	45
Figure 1.26 : Modèle de la membrane thylacoïdale indiquant les différents paramètres photosynthétiques qui caractérisent le fonctionnement du PSII.	48
Figure 1.27 : Cinétique de fluorescence modulée mesurée à l'aide d'un fluorimètre PAM....	50
Figure 1.28 : Cinétique de fluorescence modulée mesurée par le fluorimètre PAM sur une feuille d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
Figure 1.29 : Représentation des interconnexions métaboliques entre les réactions photochimiques de la photosynthèse, les réactions biochimiques du chloroplaste et du cytoplasme cellulaire	57
Figure 2.1. Voie de biosynthèse des xanthophylles chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	62
Figure 3.1 : The fresh weight and chlorophyll content of <i>L. gibba</i> exposed 96 h to Cr relative to control.....	76
Figure 3.2 : Kinetics of in vivo Chl <i>a</i> fluorescence when <i>L. gibba</i> was exposed 96 h to Cr. (a) Fluorescence yield was normalized by F_0 level. (b) Original fluorescence measurement without normalization.	77

Figure 3.3 : Value for average antenna size per PSII reaction center. Specific electron transport and specific non-photochemical energy dissipation when <i>L. gibba</i> was exposed 96 h to Cr.	78
Figure 3.4 : A : Protein gel blots analysis of thylakoid membranes isolated from <i>L. gibba</i> exposed 96 h to Cr.	79
Figure 3.5 : A : Correlation between the change of D1 protein and intracellular level of reactive oxygen species (ROS) when <i>L. gibba</i> was exposed 96 h to Cr, B : correlation between the change of D1 protein and amount of active PSII reaction centers per leaf cross-section (RC/CS) when <i>L. gibba</i> was exposed 96 h to Cr, and C : correlation between the change of intracellular level of ROS and RC/CS when <i>L. gibba</i> was exposed 96 h to Cr	80
Figure 4.1 : Effect of increased light intensity on non photochemical energy dissipation estimated by non photochemical quenching of variable chlorophyll fluorescence.	98
Figure 4.2 The change of photochemical quenching of variable chlorophyll fluorescence in relation to light intensities when <i>C. reinhardtii</i> algae were exposed 24h to dichromate.	99
Figure 4.3 : The change of the effective quantum yield Y(II) of photochemical energy conversion in PSII in relation to light intensities when <i>C. reinhardtii</i> algae were exposed 24h to dichromate.	100
Figure 4.4 : The change of non photochemical energy dissipation pathways in relation to light intensities, noted as Y(NPQ) for the quantum yield of regulated energy dissipation in PSII and Y(NO) for the quantum yield of non-regulated energy dissipation in PSII, when <i>C. reinhardtii</i> algae were exposed 24h to dichromate.	101
Figure 4.5. Effect of low and high light intensity on PSII energy dissipation pathways when <i>C. reinhardtii</i> algae were exposed 24h to dichromate.	102

Figure 4.6 : Photochemical energy conversion, non-photochemical energy dissipation via regulatory and non-regulatory mechanisms of PSII for <i>C. reinhardtii</i> algae having or not functional xanthophyll cycle.....	103
Figure 5.1 : Effect of TNT on <i>L. sativa</i> growth	116
Figure 5.2. Chlorophyll <i>a</i> fluorescence transients of <i>L. sativa</i> affected by TNT treatments. Each fluorescence induction curve represents the average of at least six leaves measurements.....	117
Figure 5.3. Chlorophyll <i>a</i> fluorescence analysis of <i>L. sativa</i> affected by TNT. A : PAM fluorescence measurement; B : the change of F_0 fluorescence yield	118
Figure 5.4. Effect of TNT on the PSII reduction state (A) and non-photochemical dissipation of absorbed light energy (B) when <i>L. sativa</i> has been treated by TNT.	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Nomenclature des différentes formes des espèces réactives de l'oxygène.	31
Table 4.1. Inhibitory effect of dichromate on cell growth and chlorophyll synthesis when <i>C. reinhardtii</i> genotypes were exposed 24h.	97
Tableau 5.1 : The textural characteristics of the soil used for TNT treatment.	115

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABS/RC :	Absorption de photons par centre réactionnel du PSII
ADP :	Adénosine diphosphate
ATP :	Adénosine triphosphate
CDO :	Complexe de dégagement d'oxygène
Chl <i>a</i> :	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i> :	Chlorophylle <i>b</i>
¹ Chl, ³ Chl, *Chl :	Chlorophylle à l'état singulet, triplet et excité
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
Cyt b ₆ f :	Cytochrome b ₆ f
DCPIP :	2,6-dichlorophenol indophenol
DPC :	Diphényl carbazide
DI ₀ /RC :	Dissipation de l'énergie par voie non photochimique par centre réactionnel du PSII ou « <i>Non photochemical energy dissipation per reaction center</i> »
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène
ET ₀ /RC :	Transport d'électrons par le centre réactionnel du PSII ou « <i>Electron transport flux per reaction center</i> »
F :	Fluorescence variable induite par une illumination actinique continue
F _M :	Fluorescence maximale induite par un flash saturant après adaptation à l'obscurité
F' _M :	Fluorescence maximale induite par un flash saturant sous illumination actinique continue
F ₀ :	Fluorescence de base obtenue par une lumière analytique modulée après adaptation à l'obscurité
F' ₀ :	Fluorescence de base obtenue par une lumière analytique modulée après illumination dans le rouge lointain (735 nm)
F _{50μs} :	Intensité de fluorescence à 50 μs
FAD :	Flavin adénine dinucléotide

Fdx :	Ferrédoxine
FNR :	Ferrédoxine NADP-réductase (ferrédoxine : NADP ⁺ oxydoréductase, EC 1.18.1.2)
Fv :	Fluorescence variable
KDa :	KiloDalton
LA :	Lumière actinique
LHCI et LHCII :	Complexe collecteur de lumière (<i>Light Harvesting Complexes</i>) du PSI et du PSII
LM :	Lumière modulée
LS :	Lumière saturante
NADP ⁺ , NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée (NADP ⁺), et sous forme réduite (NADPH)
O-K-J-I-P :	Transitions de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne
OE :	« <i>Oxygen evolving complex</i> » ou complexe de dégagement d'oxygène
PAM :	« <i>Pulse Amplitude Modulated</i> »
PC :	Plastocyanine
PEA :	« <i>Plant Efficiency Analyzer</i> »
Phéo :	Phéophytine
Pi :	Phosphate inorganique
PQ :	Plastoquinone
PQH ₂ :	Plastoquinol
PSI :	Photosystème I
PSII :	Photosystème II
P680 :	Centre réactionnel du PSII
P700 :	Centre réactionnel du PSI
Q _A :	Quinone A, accepteur primaire d'électron du PSII
Q _B :	Quinone B, accepteur secondaire d'électron du PSII
Q _E :	Composant du « <i>quenching</i> » non-photochimique dépendant de la formation d'un gradient de protons transmembranaire

Q_I :	Composant du « <i>quenching</i> » non-photochimique dépendant des photodommages au niveau du PSII causés par la photoinhibition
q_N :	« <i>Quenching</i> » non-photochimique
q_P :	« <i>Quenching</i> » photochimique
Q_T :	Composant du « <i>quenching</i> » non photochimique dépendant des états de transitions
RC :	Centre réactionnel du photosystème
RL :	Lumière dans le rouge lointain (735 nm)
RUBISCO :	Ribulose biphosphate carboxylase (3-phospho-D-glycérate carboxy-lyase, EC 4.1.1.39)
SDS-PAGE :	<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ou électrophorèse en gel de polyacrylamide
TNT :	Trinitrotoluène
Tyr _Z :	Résidu tyrosine de la protéine D1
Vde :	Violaxanthine dé-époxydase (EC 1.10.99.3)
Y _Z :	Donneur secondaire d'électrons du PSII
ϕ_M :	Efficacité photochimique maximale du PSII pour une plante adaptée à l'obscurité
ϕ'_M :	Efficacité photochimique opérationnelle du PSII à l'état stationnaire du transport d'électrons pour une plante adaptée à une illumination actinique continue

RÉSUMÉ

Le projet de recherche de cette thèse consiste à investiguer les mécanismes d'inhibition du transport d'électrons photosynthétiques induite par les xénobiotiques qui affectent les réactions photochimiques du photosystème II (PSII). Des méthodes fluorimétriques et biochimiques ont été utilisées pour étudier les effets de xénobiotiques sur les réactions photochimiques et le transport des électrons photosynthétiques. Le changement des différents paramètres de fluorescence chlorophyllienne, indiquant la dissipation de l'énergie via le transport d'électrons ou via les voies non photochimiques, a été utilisé comme indicateur de toxicité de xénobiotiques. L'induction du stress oxydatif a été analysée par l'investigation de la teneur en espèces réactives de l'oxygène. Nous avons utilisé les plantes *Lemna gibba* et *Lactuca sativa* ainsi que l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* comme matériel pour les expériences.

Dans la partie concernant l'étude des mécanismes de toxicité du dichromate chez *L. gibba*, nous avons démontré que ce xénobiotique inhibe le transport d'électrons du PSII et induit la dissipation d'énergie sous forme non photochimique. Sous ces conditions, une inhibition de l'activité photochimique du PSII et une diminution de la proportion des centres réactionnels en état fonctionnel ont été obtenues. Le changement du rendement et de la cinétique rapide de fluorescence montre que le dichromate induit une inhibition du complexe de la photolyse de l'eau et de la réduction de l'accepteur primaire d'électrons (Q_A). Ces effets ont été associés à l'altération de la protéine D1 du centre réactionnel du PSII, ainsi que la protéine 33 kDa constituant le complexe de photolyse de l'eau. L'induction d'un stress oxydatif a été démontrée par l'augmentation de la teneur en espèces réactives de l'oxygène chez les plantes exposées au dichromate. La diminution de la proportion des PSII en état fonctionnel et la formation des espèces réactives de l'oxygène induites par le dichromate ont été corrélées avec le changement des polypeptides D1. On a pu établir que l'altération fonctionnelle de l'activité du PSII par le dichromate est étroitement associée au changement structural se produisant dans le complexe PSII.

Nous avons également investigué les effets toxiques du dichromate sur l'activité du PSII chez des algues ayant une faible capacité de dissipation de l'énergie sous forme non photochimique. On a utilisé deux algues mutantes de *C. reinhardtii* qui ont une altération de la biosynthèse de pigments xanthophylles : le premier mutant, *npq1*, est déficient en zéaxanthine et le deuxième, *npq2*, est déficient en violaxanthine et accumule la zéaxanthine. On a étudié l'effet du dichromate sur l'activité du PSII sous des conditions lumineuses favorisant la photoinhibition. Après exposition au dichromate, ces algues ont été illuminées par différentes intensités lumineuses pour mesurer le changement du rendement photochimique opérationnel du PSII et la dissipation de l'énergie sous forme non photochimique. L'exposition aux dichromate des mutants *npq1* et *npq2* a induit une inhibition de transport d'électrons de PSII à faible intensité lumineuse, indiquant une accélération de la photoinhibition par le dichromate. Lorsque ces mutants d'algues ont été exposés aux dichromate et à une intensité lumineuse élevée, la dissipation d'énergie sous forme non photochimique, impliquant des processus non régulateurs, est devenue majoritaire, atteignant la valeur de 80 %. Par conséquent, les mutants d'algues *npq1* et *npq2* ayant le cycle de xanthophylles non fonctionnel étaient plus sensibles aux effets toxiques du dichromate. Ces

résultats ont permis l'élaboration d'un modèle des effets du dichromate sur l'activité du PSII chez les algues ayant un cycle de xanthophylles non fonctionnel.

Dans la troisième partie, on a analysé les effets toxiques du trinitrotoluène sur le changement des paramètres de fluorescence utilisés comme indicateurs de toxicité sur la photosynthèse et l'état physiologique de *Lactuca sativa*. L'activité photosynthétique a été mesurée en utilisant la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne et la fluorimétrie modulée. Nos résultats ont montré une diminution de la fluorescence variable provoquée par la désactivation des centres réactionnels PSII. En plus de cet effet, les paramètres de fluorescence indiquant l'état de réduction du PSII et la dissipation d'énergie sous forme non photochimique ont été les indicateurs les plus sensibles de la toxicité du trinitrotoluène. Ces paramètres ont montré une dépendance entre l'inhibition de l'activité du PSII et la concentration du trinitrotoluène. Le changement des paramètres photosynthétiques de fluorescence était une indication fiable de l'état physiologique des plantes exposées à ce polluant. Nous avons proposé que l'état de réduction du PSII et la dissipation non photochimique de l'énergie représentent des indicateurs utiles dans les bioessais.

Mots clés :

Xénobiotiques, bioessais, fluorescence chlorophyllienne, réactions photochimiques, photosystème II, chrome hexavalent, trinitrotoluène, fluorométrie PAM et PEA.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis quelques décennies, l'accroissement et la diversité des activités humaines se sont accompagnés de la dispersion dans l'environnement de quantités parfois considérables de xénobiotiques nocifs pour la santé humaine. Dans plusieurs pays, l'accumulation des polluants dans les écosystèmes a conduit, au fil des ans, à la détérioration de la qualité de l'environnement, au déclin des forêts et à la diminution de la productivité agricole (Chapelka et Samuelson, 1998 ; Gérin *et al.*, 2003 ; Wahid, 2006). De ce fait, la pollution des écosystèmes par les xénobiotiques a pris un grand intérêt sur les plans environnemental et scientifique. Les activités humaines constituent la source principale de pollution des écosystèmes par les xénobiotiques. Les activités domestiques libèrent des fertilisants (phosphates de lessive) et divers polluants organiques qui contaminent les écosystèmes aquatiques (Garcia-Pintado *et al.*, 2007). Les industries (métallurgiques et minières par exemple) et le transport urbain ont été à l'origine de la pollution de la biosphère par les métaux lourds (comme le cadmium, le chrome, le plomb et le mercure) et les hydrocarbures (Guo *et al.*, 2007 ; Sprovieri *et al.*, 2007). À la différence des polluants organiques, les métaux ne sont pas biodégradables ; ils sont uniquement transformés d'un état d'oxydation à un autre ou ils forment des complexes avec les matières organiques ayant une biodisponibilité différente dans l'écosystème (Wade *et al.*, 1993). Les activités militaires se sont accompagnées de la contamination des sols et sédiments par des composés nitroaromatiques comme le trinitrotoluène (TNT), le octahydro-tetranitro-tetrazocine (HMX) et le hexahydro-trinitro-triazine (RDX) qui peuvent avoir des effets nocifs sur la qualité des sols (Talmage *et al.*, 1999 ; Lewis *et al.*, 2004). L'agriculture intensive consomme beaucoup d'engrais qui polluent la nappe phréatique, les lacs et les rivières avec des phosphates et des nitrates (Ju *et al.*, 2007 ; Singh *et al.*, 2007). L'agriculture utilise aussi les pesticides qui libèrent des résidus toxiques pour les organismes aquatiques (Thompson *et al.*, 2006).

De ce fait, la surveillance de la qualité de l'environnement a promu le développement de différents bioessais pour détecter la présence de polluants dans les écosystèmes. Dans ces milieux, les plantes et les algues sont parmi les premiers organismes susceptibles d'être affectés par les polluants. Ces organismes utilisent l'énergie solaire pour la synthèse de la

matière organique nécessaire pour la survie des autres organismes des niveaux trophiques supérieurs; ils forment donc un maillon important entre les milieux pollués et les autres formes de vie. Il devient ainsi essentiel d'effectuer les études de toxicité pour identifier les altérations physiologiques induites par les polluants chez les organismes photosynthétiques, car, les polluants risquent de réduire la production de la biomasse végétale par l'inhibition de la photosynthèse. Dans le système cellulaire des plantes, la photosynthèse représente un processus physiologique primordial pour le métabolisme général de la cellule. Les mesures des réactions photochimiques ou biophysiques de la photosynthèse peuvent donc transmettre des informations importantes sur l'état physiologique des plantes. La majorité des polluants peuvent affecter la photosynthèse de deux façons : (1) directement, en inhibant les réactions photochimiques et le transport des électrons au niveau des photosystèmes ; (2) indirectement, en altérant des processus métaboliques étroitement liés à la photosynthèse (l'assimilation de carbone, la photorespiration, le métabolisme de l'azote, la synthèse des lipides, des protéines et de pigments). Ces altérations de l'efficacité photosynthétique peuvent donc induire des effets néfastes sur la croissance et le développement des plantes et des algues.

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne est privilégiée pour les études fondamentales et également appliquées, oeuvrant dans le domaine de la recherche de la photosynthèse. La mesure et l'analyse de la cinétique de la fluorescence permettent d'estimer plusieurs paramètres, eux-mêmes renseignant sur l'efficacité des processus photochimiques et biochimiques de la photosynthèse. Donc, ces paramètres peuvent être utilisés pour évaluer l'état physiologique des plantes quand elles sont exposées aux xénobiotiques. Cependant, plusieurs questions fondamentales subsistent au sujet de l'interprétation de ces paramètres au niveau moléculaire, et de leurs significations physiologiques. Par exemple, il est important de déterminer si le changement de ces paramètres induit par un xénobiotique s'accompagne par une altération fonctionnelle et structurelle de l'appareil photosynthétique. Dans notre étude, la fluorescence chlorophyllienne a été utilisée pour étudier et interpréter les mécanismes de toxicité des xénobiotiques sur l'activité photosynthétique. Il s'agit de mieux comprendre la relation entre les changements des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne et le fonctionnement à l'échelle moléculaire de l'appareil photosynthétique. L'avancement de ces connaissances permet alors d'utiliser certains paramètres de la fluorescence chlorophyllienne

comme biomarqueurs d'effets toxiques de polluants à l'aide de bioessais. Les effets toxiques de polluants sur la photosynthèse ont été également étudiés par les changements des composantes protéiques qui jouent un rôle essentiel dans les réactions photochimiques de la photosynthèse. L'état physiologique des plantes a été également estimé par les paramètres indiquant la croissance de la biomasse ou la formation d'espèces réactives de l'oxygène comme indicateurs du stress oxydatif. Complémentaire à cette approche, l'utilisation des algues ayant des mutations qui affectent certains processus régulateurs de la photosynthèse, permet de comprendre le fonctionnement de l'appareil photosynthétique quand il est exposé aux polluants ou à un changement des conditions de croissance. La comparaison de la sensibilité de l'ensemble de ces paramètres photosynthétiques et physiologiques permet, d'une part, de comprendre les mécanismes de toxicité des polluants et, d'autre part, d'améliorer les biomarqueurs utilisés dans les bioessais de toxicité utilisant des plantes ou des algues vertes.

Les problématiques et les objectifs spécifiques des projets de recherches réalisés dans cette thèse sont présentés au chapitre II. Le chapitre I comprend une synthèse bibliographique sur le contexte théorique de l'ensemble des projets de recherche effectués.

CHAPITRE I

INTERACTION DE XÉNOBIOTIQUES AVEC LE FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE ET INDUCTION DU STRESS OXYDATIF

1.1 LES ASPECTS STRUCTURELS ET FONCTIONNELS DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE IMPLIQUÉS DANS LE TRANSPORT DES ÉLECTRONS PHOTOSYNTHÉTIQUES

1.1.1 Les deux phases de la photosynthèse

Le processus de la photosynthèse comprend un ensemble de réactions permettant aux plantes et aux algues d'utiliser l'énergie lumineuse pour la convertir en énergie chimique. Ce processus s'accompagne d'un dégagement d'oxygène par l'oxydation de l'eau, ce qui permet la réduction du dioxyde de carbone (CO₂) et la synthèse des glucides selon la réaction suivante (Whitmarsh et Govindjee, 1999) :

$$6 \text{ CO}_2 + 12 \text{ H}_2\text{O} + \text{Énergie lumineuse} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + \text{Dissipation d'énergie sous forme de fluorescence et de chaleur}$$

Cette réaction globale de la photosynthèse se déroule en deux étapes différentes. La première étape comprend les réactions photochimiques qui induisent un transport d'électrons entre les photosystèmes II et I, ce qui permet la formation de réserve d'adénosine triphosphate (ATP) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH). Pendant la deuxième phase, l'ATP et le NADPH sont utilisés, comme source d'énergie, pour l'assimilation et la transformation du CO₂ en glucides au cours du cycle de Calvin, ainsi que pour d'autres processus biochimiques étroitement dépendants de la photosynthèse (Blankenship, 2002). Les deux processus photochimiques et biochimiques de la photosynthèse se déroulent dans un organe cellulaire spécialisé appelé chloroplaste (Figure 1.1). Grâce aux progrès de la microscopie électronique, la structure du chloroplaste a été bien caractérisée (Mustárdy et Garab, 2003 ; Shimoni *et al.*, 2005). Le chloroplaste a deux membranes qui séparent la partie interne du chloroplaste (le stroma) du cytoplasme cellulaire. Pendant le fonctionnement de la photosynthèse, le maintien de l'intégrité de ces membranes

est essentiel car elles permettent le transport des molécules d' O_2 et CO_2 , des ions Mg^{2+} , Ca^{2+} et H^+ ainsi que des molécules de glucides ($C_6H_{12}O_6$). Dans le stroma, on distingue un ensemble d'enzymes et de cofacteurs participant aux réactions biochimiques de la photosynthèse. Le stroma contient également un réseau membranaire appelé thylacoïdes, qui comprend des complexes de pigments-protéines effectuant les réactions photochimiques de la photosynthèse (Dekker et Boekema, 2005).

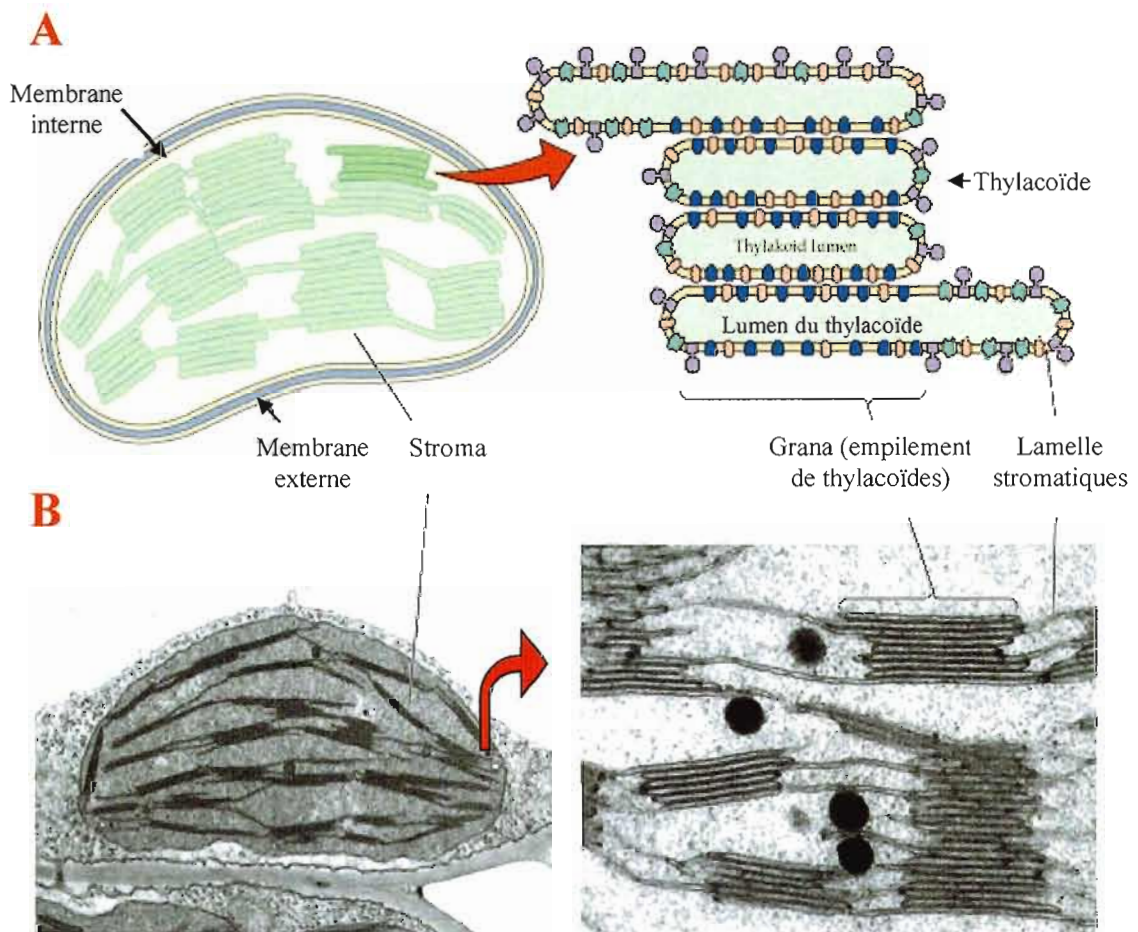


Figure 1.1 : A) Structure schématique d'un chloroplaste. B) Micrographie électronique d'un chloroplaste (d'après Malkin et Niyogi, 2000).

Les thylacoïdes sont constitués d'un ensemble de vésicules aplaties (les lamelles) qui sont empilées pour former les granas (10 à 20 lamelles). Les granas sont ensuite reliées entre

eux par des thylacoïdes simples non empilés, désignés par lamelles stromatiques (Mustárdy et Garab 2003). L'espace présent à l'intérieur du thylacoïde est désigné par lumen. On distingue dans les membranes du thylacoïde différents complexes de pigments-protéines qui participent aux réactions photochimiques et au transport des électrons photosynthétiques (Malkin et Niyogi, 2000 ; Dekker et Boekema, 2005) : (i) Les antennes collectrices de lumière (*light harvesting complexes* : LHCII et LHCI) formées de pigments photosynthétiques liés à des protéines membranaires. (ii) Les centres réactionnels du photosystème II (PSII) et du photosystème I (PSI), vers lesquels l'énergie lumineuse (absorbée par les LHCII et LHCI) est transférée pour effectuer les réactions photochimiques primaires. (iii) Une chaîne de transporteurs protéiques d'électrons situés entre le PSII et le PSI, composés de plastoquinones (PQ), de complexes cytochromes b_6f et de plastocyanines (PC). (iv) Le système enzymatique d'ATP synthétase (ATP phosphohydrolase, EC 3.6.3.14) qui catalyse la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique. Ces complexes de pigments-protéines ne sont pas distribués uniformément dans les membranes des thylacoïdes. En effet, les complexes du PSII et leurs antennes collectrices de lumière se situent en majorité dans le grana, tandis que, les PSI, leurs antennes collectrices de lumière et l'ATP synthétase se situent dans les lamelles stromatiques et les régions marginales du grana. Les cytochromes b_6f peuvent exister dans le grana ainsi que dans les lamelles stromatiques (Figure 1.2 ; Allen et Forsberg, 2001).

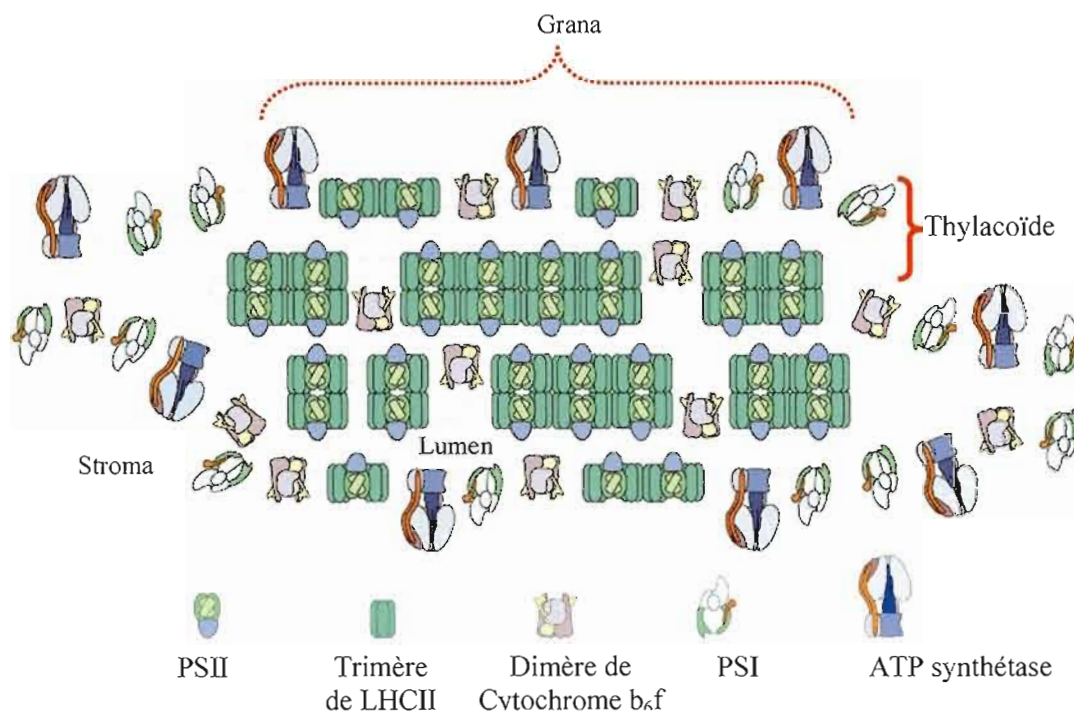


Figure 1.2 : Représentation schématique de la répartition des complexes pigments-protéiques dans les membranes thylacoïdales chez la plante de tabac (d'après Allen et Forsberg, 2001).

1.1.2 La structure du photosystème II

Pendant la réaction photochimique, le PSII effectue la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Pour réaliser cette fonction, le PSII est constitué de complexes pigments-protéines (contenant environ 200 à 300 molécules de chlorophylles et 50 molécules de caroténoïdes), des complexes métallo-protéiques (une vingtaine de polypeptides, deux quinones Q_A et Q_B , un atome de fer, deux molécules de phéophytine, une ou deux molécules de cytochrome b_{559}), d'un cluster de manganèse et des ions de chlorure et de calcium utilisés comme cofacteurs (Barber *et al.*, 1997; Minagawa et Takahashi, 2004). Ces complexes forment des sous-unités fonctionnelles étroitement liées et essentielles pour un fonctionnement optimal du PSII (Figure 1.3 ; Szabo *et al.*, 2005). En effet, les antennes collectrices de lumière absorbent l'énergie lumineuse et la transfèrent aux centres réactionnels, où s'effectuent les réactions photochimiques.

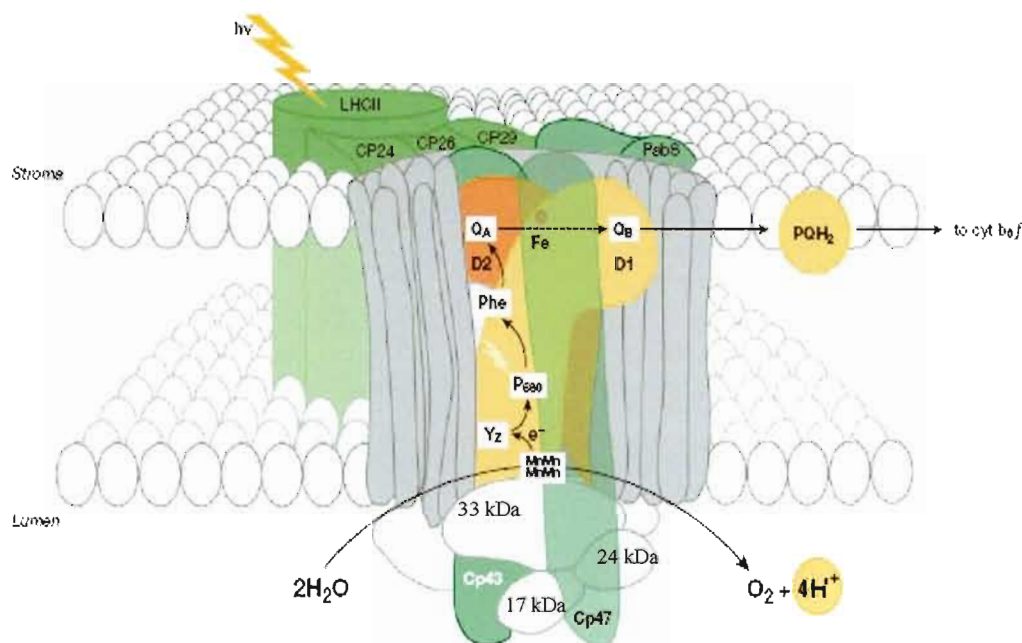


Figure 1.3 : Modèle structural du PSII montrant les deux protéines majeures du PSII (D1 et D2), la paire spéciale de la chlorophylle *a* du centre réactionnel (P680), le complexe de photolyse de l'eau (constitué de 3 protéines de poids moléculaire 33, 24 et 17 kDa) et son « cluster » de manganèse, les protéines constituant l'antenne collectrice de lumière (LHCII, CP24, CP26 et CP29) et les protéines liant la chlorophylle *a* : la CP43 et CP47 (d'après Szabo *et al.*, 2005).

1.1.2.1 Les antennes collectrices de lumière du photosystème II

Les antennes collectrices de lumière du PSII sont constituées de deux complexes : l'antenne interne et l'antenne périphérique. L'antenne interne est étroitement associée au centre réactionnel du PSII (voir Figure 1.3). Elle est constituée de deux protéines, CP43 et CP47 (codées par les gènes chloroplastiques *psbC* et *psbB*, respectivement), qui sont liées à environ 40 à 50 molécules de Chl *a* et à une dizaine de molécules de β -carotène (Barber et Kuhlbrandt, 1999). Ces deux complexes permettent le transfert de l'énergie lumineuse vers la chlorophylle du centre réactionnel (P680). La protéine CP47, liée au polypeptide de 33 kDa du complexe de photolyse de l'eau, est impliquée dans la stabilisation du « cluster » de manganèse (Green et Durnford, 1996).

L'antenne périphérique est constituée de complexes pigments-protéines désignés par LHCII (*light harvesting complexes*), CP29, CP26 et CP24 (voir Figure 1.3). Chacun de ces complexes est formé de protéines codées par le génome nucléaire. Ces protéines lient la Chl *a* et la Chl *b* ainsi que des molécules de caroténoïdes, comme la lutéine, la néoxanthine, la violaxanthine et la zéaxanthine (Bassi *et al.*, 1997). La composition pigmentaire et la taille des antennes périphériques peuvent varier selon les conditions lumineuses auxquelles les plantes sont exposées (Horton *et al.*, 1996). Le complexe LHCII, au sens strict, constitue l'antenne majeure du PSII, car il contient entre 50 et 65 % de la quantité totale de la chlorophylle (*a* et *b*) et le tiers du contenu total en protéines des membranes thylacoïdales (Thorner *et al.*, 1991). Le LHCII est composé de trois types de polypeptides désignés par Lhcb1, 2 et 3 (codés par les gènes *Lhcb1*, 2 et 3) dont le poids moléculaire est compris entre 24 et 29 kDa (Green et Durnford, 1996). Les complexes pigments-protéines CP29, CP26 et CP24 (aussi connues sous le nom de Lhcb4, Lhcb5 et Lhcb6, respectivement) contiennent une quantité plus faible de Chl *b* que le LHCII. Ils comprennent aussi 5 à 20 % de la chlorophylle totale liée au PSII (Barber et Kuhlbrandt, 1999). Ces protéines sont situées à la périphérie du LHCII et permettent le transfert de l'énergie d'excitation du LHCII au centre réactionnel du PSII via les CP43 et CP47 (Bassi *et al.*, 1997). Chez les plantes et les algues vertes, les métaux lourds (comme le cadmium et le chrome hexavalent) et les herbicides (atrazine par exemple) peuvent induire une inhibition de la synthèse de la chlorophylle par l'inhibition de l'activité de l'enzyme protochlorophyllide réductase (Gonzalez-Barreiro *et al.*, 2004 ; Mysliwa-Kurdiel et Strzalka, 2005). De façon similaire, le cuivre peut inhiber la synthèse de la chlorophylle en diminuant l'absorption par les plantes du fer qui est un cofacteur essentiel pour la formation de la chlorophylle (Patsikka *et al.*, 2002). Sous ces conditions, la formation des LHCII et du centre réactionnel du PSII en état fonctionnel peut être altérée, ce qui diminue l'activité photosynthétique et la croissance des plantes.

1.1.2.2 Le centre réactionnel du photosystème II

Le centre réactionnel du PSII est constitué de deux protéines majeures D1 et D2 dont le poids moléculaire est de 32 et 34 kDa, respectivement (Figure 1.3). Les protéines D1 et D2 sont codées par les gènes chloroplastiques *psbA* et *psbD*, respectivement. C'est au niveau de

la protéine D1 que s'effectue le processus de la séparation de charges, c'est-à-dire la réaction photochimique initiant le transport des électrons entre le PSII et le PSI (Dekker et Van Grondelle, 2000). Les protéines D1 et D2 assurent aussi la stabilité des pigments et des transporteurs d'électrons situés au niveau du PSII. Le centre réactionnel contient également une paire spéciale de chlorophylle *a* (notée P680) qui joue un rôle primordial dans la séparation de charges. De ce fait, le centre réactionnel du PSII a été désigné par P680 et possède une absorption maximale de la lumière à une longueur d'onde de 680 nm (Govindjee et Coleman, 1990).

Chez les plantes exposées à la lumière, les métaux lourds peuvent accélérer le processus de photoinhibition du PSII en induisant une inhibition du transport d'électrons et des dommages aux composantes protéiques qui constituent le centre réactionnel du PSII (Giardi *et al.*, 1997). Par exemple, le cadmium (5 μM) induit une diminution de la teneur des protéines D1 et D2 chez la plante *Oryza sativa* exposée 30 min à une lumière d'intensité 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ces résultats indiquent une altération par le cadmium du « turnover » de la protéine D1 par l'inhibition de la synthèse des polypeptides D1 ou par l'augmentation de leur dégradation. Dans les mêmes conditions, les polypeptides associés aux antennes collectrices de lumière, CP43 et LHCII, ne sont pas affectés par les effets toxiques de ce métal (Pagliano *et al.*, 2006). En estimant l'incorporation de la méthionine radioactive dans les polypeptides D1 par radiodétection « Pulse-chase », il a été démontré que le cadmium (1 mM) induit après 24h une inhibition de la synthèse de la protéine D1 chez la plante *Pisum sativum*. Dans ces conditions, l'activité photochimique du PSII a été diminuée (Franco *et al.*, 1999).

Comme les métaux, la plupart des herbicides induisent une inhibition de l'activité du PSII mais leurs effets sur les polypeptides D1 semblent être variables. Les herbicides de type phénoliques peuvent inhiber le transport d'électrons du PSII en se liant au site quinone B (Q_B) de la protéine D1, accélérant ainsi la photoinhibition du PSII et la dégradation de la protéine D1 via la formation d'espèces réactives de l'oxygène (l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ en particulier; Nakajima *et al.*, 1996 ; Fufezan *et al.*, 2002). Les herbicides de type urée/triazine (DCMU et atrazine, par exemple) se fixent également au site Q_B , induisant une inhibition du transport d'électrons entre les PSII et PSI. Cependant, ces herbicides induisent peu d'effets sur la protéine D1 et la photoinhibition du PSII, comparativement aux herbicides de type

phénoliques (Nakajima *et al.*, 1996). Ce ralentissement de la photoinhibition du PSII par les herbicides urée/triazine est supposé être associé à un retardement de la formation de Q_A à l'état réduit, et à une faible production de l'oxygène singulet (Kirilovsky *et al.*, 1994 ; Fufezan *et al.*, 2002).

1.1.2.3 Le complexe de la photolyse de l'eau

Chez les plantes supérieures, le système enzymatique effectuant la photolyse de l'eau est composé d'un « *cluster* » de manganèse (Mn_4Ca) et de trois polypeptides extrinsèques de 33, 24 et 17 kDa, codés par les gènes nucléaires *psbO*, *psbP* et *psbQ*, respectivement (voir Figure 1.3 ; De Las Rivas *et al.*, 2004). La présence de ces polypeptides est essentielle pour la stabilité et le fonctionnement adéquat du PSII. Le polypeptide de 33 kDa permet essentiellement le maintien de la stabilité du « *cluster* » de manganèse et la liaison des ions Cl^- et Ca^{2+} au système de photolyse de l'eau (Miyao et Murata, 1984 ; Heredia et De Las Rivas, 2003 ; Popelkova *et al.*, 2006). Quand le pH du lumen est acide (5.7 environ), ce polypeptide de 33 kDa subit des changements de conformation favorisant la liaison des ions Mn^{2+} et Ca^{2+} (Shutova *et al.*, 2005). Cette protéine est essentielle pour maintenir les PSII en état fonctionnel en préservant la stabilité des protéines CP47, CP43, D1 et 17 kDa au sein du complexe PSII (Yi *et al.*, 2005). Les polypeptides de 24 kDa et 17 kDa permettent un rendement optimal du dégagement d'oxygène en ajustant la quantité des ions Ca^{2+} et Cl^- comme cofacteurs nécessaires pour la réaction d'oxydation de l'eau (Seidler, 1996 ; Haumann et Junge, 1999 ; Wincencjusz *et al.*, 1999). La protéine de 17 kDa fixe l'ion Ca^{2+} puisque son altération spécifique par la chaleur va induire une dissociation de l'ion Ca^{2+} du « *cluster* » de manganèse et donc une inhibition de la photolyse de l'eau (Barra *et al.*, 2005). Les polypeptides 24 et 17 kDa permettent également la liaison de plusieurs complexes de PSII, ce qui permet la formation de structures macromoléculaires des PSIIs et les accolements de *grana* des thylacoïdes (Suorsa et Aro, 2007).

L'inhibition induite par les métaux lourds au niveau du transport photosynthétique des électrons peut être associée à l'altération de certains polypeptides du complexe de photolyse de l'eau. Ces effets toxiques des métaux, sur les protéines du complexe de photolyse de l'eau, varient selon le mécanisme de toxicité du métal ou les différences de

conditions expérimentales utilisées. Par exemple, l'inhibition de l'activité du PSII par le mercure a été associée avec l'altération du polypeptide 33 kDa, sans affecter les polypeptides 24 et 17 kDa qui représentent le système de photolyse de l'eau des membranes thylacoïdales de *Spinacea oleracea* (Bernier et Carpentier 1995). Cependant, l'inhibition de l'activité du PSII par d'autres métaux, comme le plomb et le zinc, a été reliée à des dommages du polypeptide 24 kDa et partiellement à ceux concernant le polypeptide de 33 kDa dans les membranes thylacoïdales de *S. oleracea* (Rashid *et al.*, 1994). Chez *Zea mays*, l'inhibition de l'activité du PSII par le cuivre a été associée à une altération de la protéine 17 kDa, sans affecter toutefois les protéines 24 et 33 kDa qui constituent le système de photolyse de l'eau (Baron *et al.*, 1995).

1.1.3 Les propriétés fonctionnelles du photosystème II

1.1.3.1 L'absorption de l'énergie lumineuse et son transfert au centre réactionnel

Les plantes supérieures et les algues vertes absorbent l'énergie lumineuse à l'aide de différents pigments, les chlorophylles *a* et *b* et les caroténoïdes, qui sont présents dans les antennes collectrices de lumière du PSII et PSI (Figure 1.4 ; Heller *et al.*, 1998). Chaque molécule de ces pigments absorbe efficacement la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques, ceci dépendant de sa configuration moléculaire (Figure 1.5). Quand on analyse le spectre d'absorption de l'ensemble de ces pigments, on peut constater qu'il couvre presque entièrement le spectre d'émission des radiations solaires du visible. Cette propriété permet donc une utilisation efficace de l'énergie lumineuse pour la photosynthèse (Govindjee *et al.*, 1996).

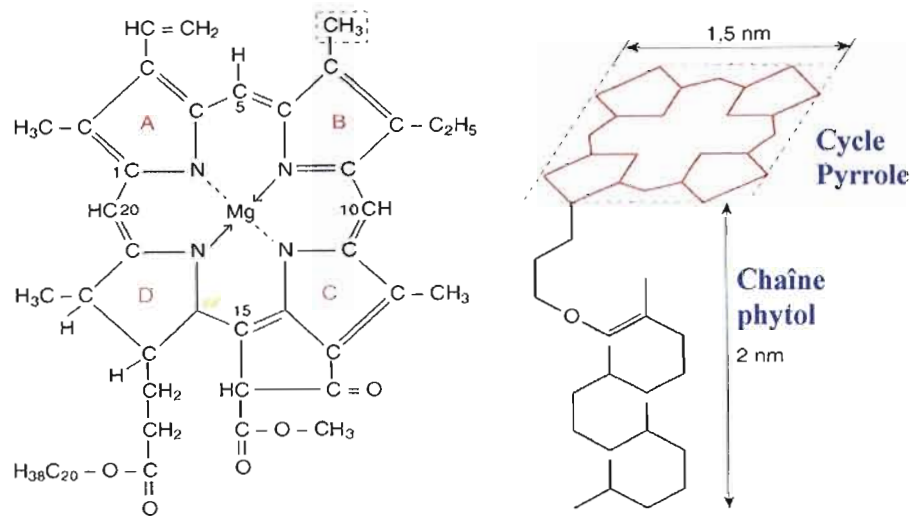


Figure 1.4 : Structure moléculaire de la chlorophylle *a*. La chlorophylle *b* ne diffère de la chlorophylle *a* que par le -CH₃ encadré, remplacé par un -CHO (d'après Heller *et al.*, 1998).

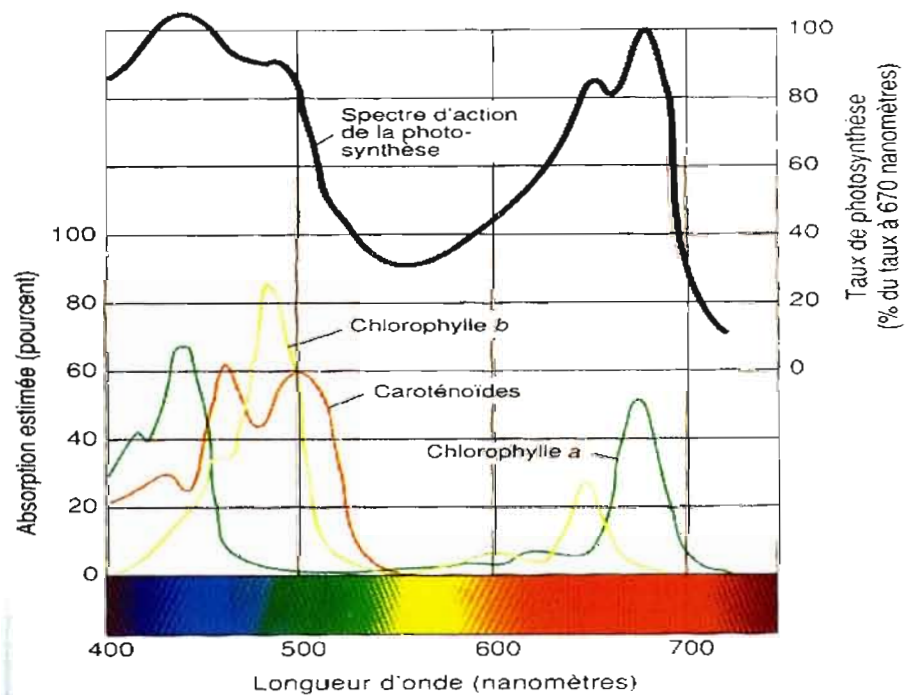


Figure 1.5 : Spectre d'absorption des chlorophylles *a*, *b* et des caroténoïdes chez les plantes supérieures (d'après Raven *et al.*, 2000).

Lorsqu'un pigment photosynthétique absorbe un photon, il passe rapidement (10^{-15} s) de l'état fondamental (ayant un faible niveau d'énergie) à l'état excité, qui a un niveau d'énergie plus élevé. Dans le cas de la chlorophylle possédant deux bandes principales d'absorption de photons, on peut distinguer deux niveaux d'énergie d'état singulet excité ($^1\text{Chl}^*$). Le premier se forme par absorption de la lumière rouge et le deuxième par celle de la lumière bleue (Figure 1.6, Buchanan *et al.*, 2000). La chlorophylle singulet à l'état excité, en dissipant une partie de son énergie d'excitation sous forme de chaleur, peut générer la forme triplet excitée ($^3\text{Chl}^*$). Cette dernière possède une durée de vie plus longue (10^{-6} à 10 s) que celle de la forme $^1\text{Chl}^*$ (10^{-10} à 10^{-6} s). Dans les antennes collectrices de lumière, l'énergie d'excitation générée par les photons absorbés est transférée aléatoirement d'un pigment à l'autre jusqu'à la paire spéciale de la chlorophylle *a* (P680) du centre réactionnel PSII (Figure 1.7 ; Raven *et al.*, 2000). C'est dans ce dimère de chlorophylle *a* que s'effectue le processus de séparation de charges induisant le transport d'électrons photosynthétiques.

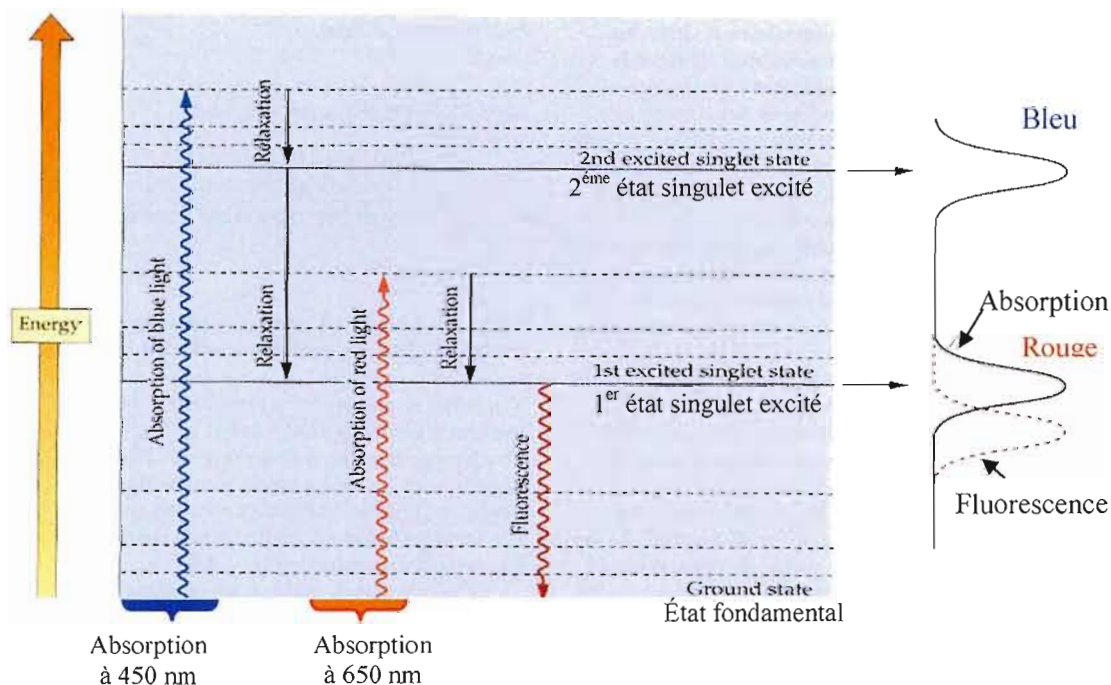


Figure 1.6 : Les niveaux d'énergie dans une molécule de chlorophylle et les mécanismes de dissipation de son énergie absorbée (d'après Buchanan *et al.*, 2000).

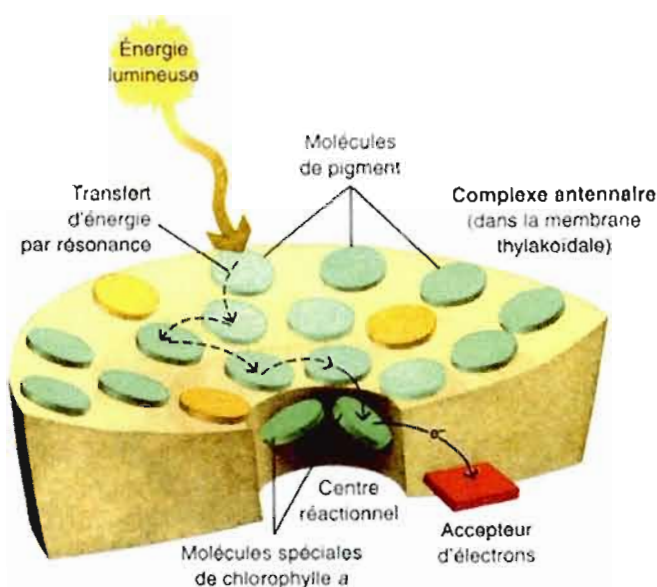


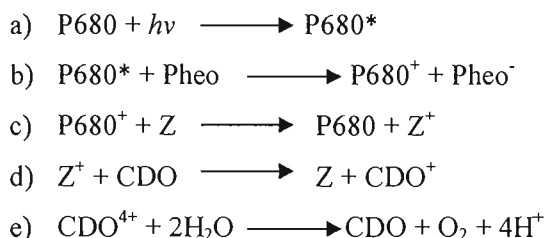
Figure 1.7 : Modèle du transfert aléatoire de l'énergie lumineuse absorbée par les pigments collecteurs de lumière jusqu'au centre réactionnel du photosystème II (d'après Raven et al., 2000).

Des études ont démontré que le mercure (Hg) induit une inhibition de la synthèse de la chlorophylle *a* chez les algues de *Synechococcus elongatus*. Cette inhibition cause une altération du spectre d'absorption et de l'émission de fluorescence (à 695 nm) de la chlorophylle *a*. Ces effets toxiques du Hg provoquent une diminution du transfert de l'énergie lumineuse absorbée par les LHCII jusqu'aux centres réactionnels du PSII (Murthy *et al.*, 1995). D'autre part, sous faible illumination (environ $20 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), certains métaux comme Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+} peuvent remplacer l'ion central Mg^{2+} de la molécule de chlorophylle du LHCII, diminuant ainsi l'efficacité photochimique du PSII (Küpper *et al.*, 1998 ; 2002). Cette diminution de l'efficacité fonctionnelle de la chlorophylle, quand l'atome de Mg^{2+} est remplacé par d'autres métaux, peut être expliquée par le fait que le Mg^{2+} , dans la chlorophylle à l'état singulet, a une plus grande capacité de libérer les électrons comparativement aux autres métaux substituants (Watanabe *et al.*, 1985). En particulier, après absorption de photons, les molécules de chlorophylles ayant le Mg^{2+} substitué par un autre métal peuvent passer par un état d'excitation instable. Sous cet état, la chlorophylle a

tendance à libérer son énergie sous forme de chaleur au lieu de la transférer aux centres réactionnels du PSII (Karukstis, 1991). Par conséquent, la formation des complexes chlorophylles-métaux peut causer une détérioration de l'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse dans les réactions photochimiques (Küpper *et al.*, 1996).

1.1.3.2 La séparation de charges et la photolyse de l'eau

Lorsque le centre réactionnel P680 reçoit l'énergie d'excitation, il passe de l'état stable P680 à l'état excité P680*. Le rendement des réactions photochimiques primaires du PSII dépendra ensuite de la séparation de charge, c'est-à-dire du transfert d'un électron du P680* vers la phéophytine *a* (Pheo). Ce transfert d'électron va créer une charge positive au centre réactionnel du PSII (P680⁺) qui recevra ensuite un électron du résidu tyrosine Z qui est le donneur primaire du PSII. Ce donneur primaire du PSII, sous forme oxydée Z⁺, acceptera ensuite un électron du complexe du dégagement de l'oxygène (CDO; Figure 1.8 ; Sproviero *et al.*, 2007). On peut résumer la séparation de charge et le dégagement d'oxygène par les cinq réactions suivantes :



L'énergie d'excitation ($h\nu$) d'un photon, transférée au centre réactionnel P680, induit les quatre réactions photochimiques successives (décrites de **a**) à **d**)) permettant la formation d'une seule charge positive au niveau du complexe de dégagement d'oxygène (CDO⁺). Par conséquent, la formation d'une molécule d'oxygène (réaction **e**)) nécessite quatre fois les réactions indiquées de **a**) à **d**). En résumé, quatre photons sont nécessaires pour la formation d'une molécule d'oxygène selon la réaction $2\text{H}_2\text{O} + 4h\nu \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ (Dekker et Van Grondelle, 2000; Faller *et al.*, 2001).

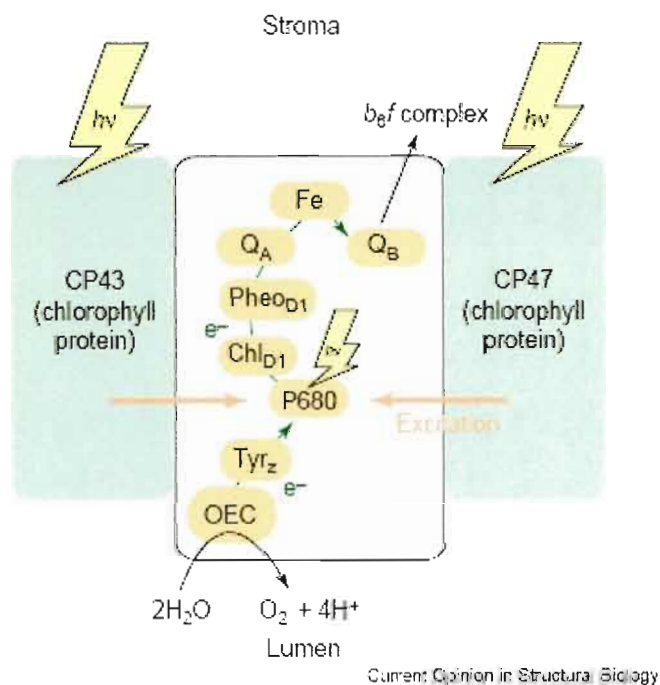


Figure 1.8 : Représentation schématique des réactions photochimiques catalysées par le photosystème II (d'après Iwata et Barber, 2004). Les abréviations utilisées sont indiquées p. xiv.

À la fin des années 1960, on a découvert que la formation d'oxygène se faisait selon un cycle composé de 5 étapes successives (désignées par les états S_0 , S_1 , S_2 , S_3 et S_4) lorsque des chloroplastes adaptés à l'obscurité étaient illuminés par une séquence d'éclairs saturants (Joliot *et al.*, 1969). Le rendement maximal de dégagement d'oxygène est obtenu après le troisième éclair et par la suite après les quatrièmes éclairs (Figure 1.9). Le modèle des états "S" proposé par Kok *et al.*, (1970) a permis de comprendre les étapes de la photolyse de l'eau qui est induite par la réaction photochimique primaire. Ainsi, chaque fois que le P680 reçoit l'énergie d'excitation, le « cluster » de manganèse (Mn_4Ca) du complexe de dégagement d'oxygène acquiert des charges positives (par perte d'électrons), offrant ainsi le potentiel nécessaire pour fractionner deux molécules d'eau en une molécule d' O_2 et 4 protons. Ces protons sont libérés dans le lumen du thylacoïde et contribuent donc au gradient de protons nécessaire à la formation de l'ATP. Pour chaque électron perdu, le complexe de photolyse de

l'eau est caractérisé par un état désigné S_N , où N représente le nombre d'électrons perdus (de 0 à 4 ; Figure 1.10 ; Barber, 2004). Lorsque l'état S_4 est atteint (par perte de 4 électrons), le complexe de dégagement d'oxygène retourne à l'état S_0 en acceptant les électrons de l'eau tout en formant l' O_2 (Renger, 2001 ; Barber, 2004). L'adaptation des plantes à l'obscurité va synchroniser la majorité des complexes de photolyse de l'eau au niveau S_1 . Pour cette raison, un dégagement d' O_2 maximum est obtenu après le troisième éclair. L'inhibition des états S provoque une inhibition du transfert d'électrons entre le résidu tyrosine Z et le $P680^+$, ce qui cause l'inactivation du PSII en bloquant le transfert d'énergie entre Q_A et Q_B réduits (Strasser, 1997).

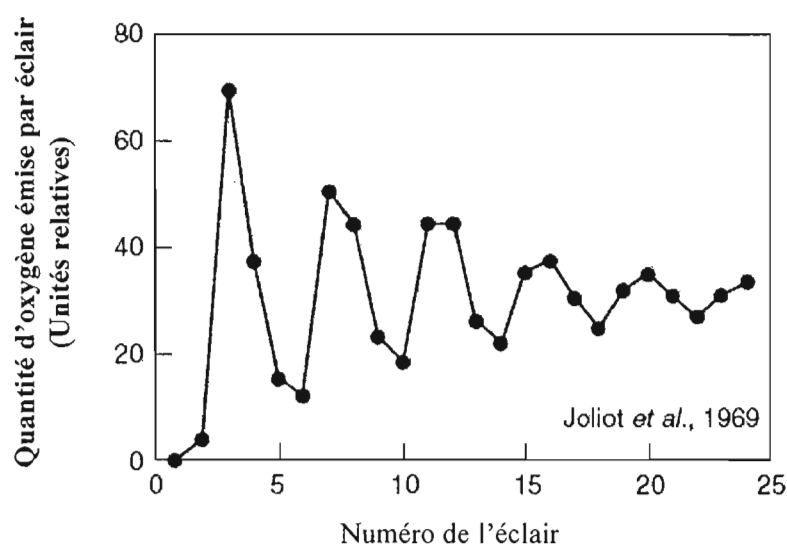


Figure 1.9 : Dégagement de l'oxygène sous l'effet d'éclairements saturants (d'après Joliot *et al.*, 1969).

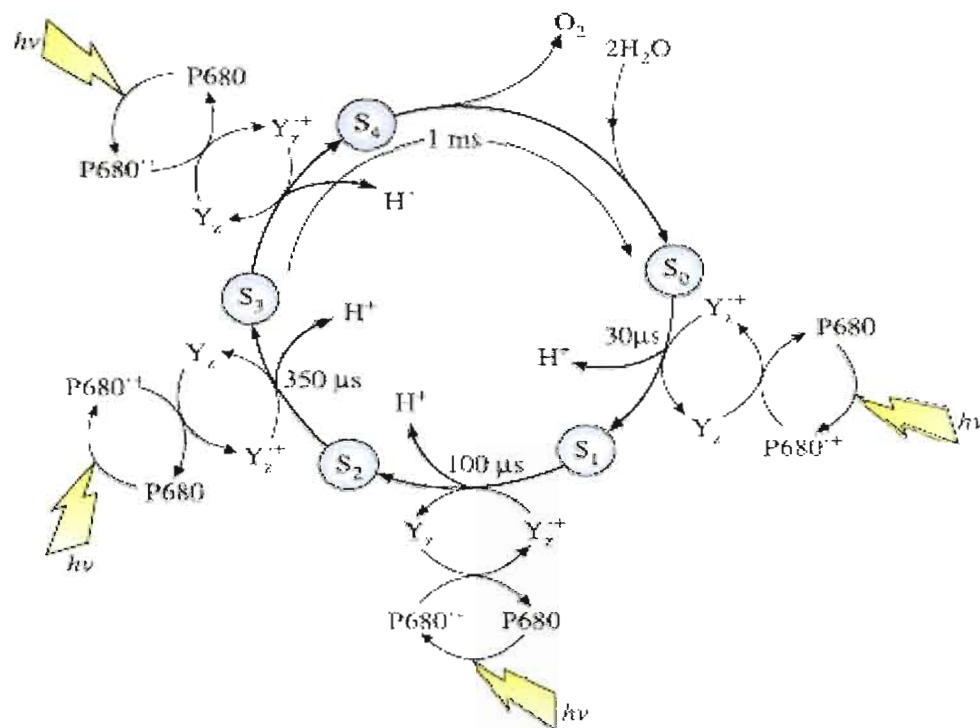


Figure 1.10 : Modèle de la formation des états S et de la production de protons pendant la photolyse de l'eau aboutissant au dégagement d'oxygène (d'après Barber, 2004). Les abréviations utilisées sont indiquées p. xiv.

1.1.3.3 Le transport des électrons

Lorsque la phéophytine *a* reçoit un électron, celui-ci est transféré par une chaîne de transporteurs d'électrons constituée de quinones (Q_A et Q_B) et de plastoquinones (PQ). La réduction de la PQ associée au site Q_B nécessite deux électrons provenant de Q_A et Q_B. Pendant ces deux réactions d'oxydoréductions successives, la PQ subit un changement de configuration stéréochimique, et elle doit capter deux protons du *stroma* pour se neutraliser (Heller *et al.*, 1998). Ces différentes étapes d'oxydoréduction entre les quinones (Q_A et Q_B) et la PQ sont résumées dans la Figure 1.11 (Whitmarsh et Govindjee, 2002).

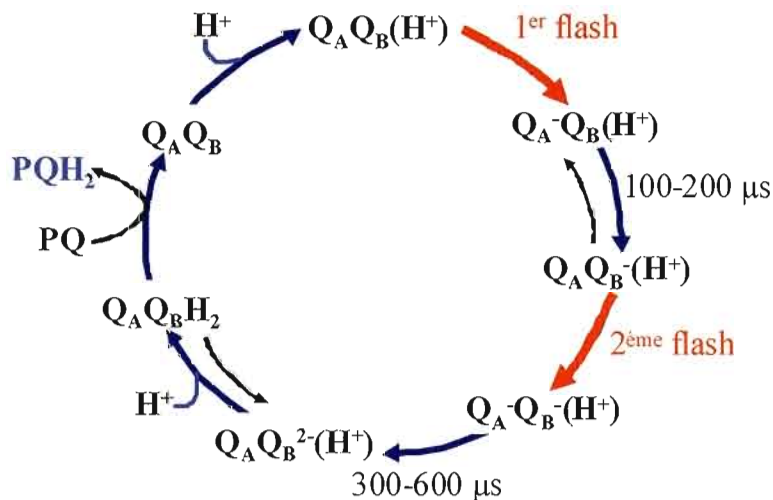


Figure 1.11 : Représentation schématique des réactions d'oxydoréduction entre les quinones A (Q_A), B (Q_B) et plastoquinone (PQ) (d'après Whitmarsh et Govindjee, 2002).

Une fois formée, la plastoquinone réduite PQH_2 se détache du site Q_B et elle va diffuser dans la membrane des thylacoïdes. Par la suite, les molécules PQH_2 réduisent les cytochromes b_6f en libérant deux protons dans le *lumen* du thylacoïde. Cette réaction participe à la formation de gradient de protons qui induit la synthèse de l'ATP. Les électrons reçus par les cytochromes b_6f sont ensuite transférés à la plastocyanine, puis au $P700^+$ du PSI (Ort, 1986; Faller *et al.*, 2001). La Figure 1.12 (A et B) résume l'ensemble des réactions s'effectuant pendant le transport linéaire des électrons. Ces transporteurs d'électrons et protons sont organisés selon un schéma thermodynamique indiqué par Z, qui dépend de leurs potentiels d'oxydoréduction (Figure 1.12 B).

La majorité des métaux lourds affectent la chaîne de transport d'électrons des deux côtés oxydant et réducteur du PSII. Chez les algues *Chlorella pyrenoidosa*, les métaux Zn, Co et Cd induisent une forte diminution du dégagement d'oxygène, indiquant une altération de l'activité catalytique du système enzymatique de photolyse de l'eau (Plekhanov et Chemeris, 2003). L'inhibition du transport d'électrons par le Hg et le Cd, mesurée dans les thylacoïdes de *Spinacea oleracea*, a été associée à deux mécanismes différents : le premier implique la propriété du Hg et du Cd de se lier aux résidus tyrosines des protéines D1 et D2 du centre réactionnel du PSII, affectant ainsi la réaction photochimique; le deuxième

mécanisme concerne leur interaction avec le « *cluster* » de manganèse, ce qui induit l'inhibition du système enzymatique de photolyse de l'eau (Sersen et Kralova, 2001). Les effets inhibiteurs du Cd, du côté oxydant du PSII, ont été associés à un remplacement, par le Cd, de l'ion Ca^{2+} du « *cluster* » de manganèse du complexe de photolyse de l'eau. Par conséquent, la formation de l'état S_2 du complexe de photolyse de l'eau a été inhibée, ce qui a induit une diminution du rendement de dégagement d'oxygène. Sous ces conditions, le transfert des électrons, entre le résidu tyrosine Z et P680^+ d'une part, et entre Q_A^- et Q_B d'autre part, est diminué, affectant par là le transport d'électrons entre les PSII et PSI (Sigfridsson *et al.*, 2004). D'autres métaux, comme le Cu, inhibent également la chaîne de transport d'électrons dans différents sites tels que le cytochrome b559 (Bernal *et al.*, 2004), le système de photolyse de l'eau (Burda *et al.*, 2003), et le centre réactionnel du PSII au niveau de Q_A , la région pheophytine- Q_A -Fe et le Q_B (Mohanty *et al.*, 1989; Jegerschold *et al.*, 1995; Yruela *et al.*, 1996). L'inhibition par le Cu du transport d'électrons du côté oxydant du PSII a été aussi associée à une substitution de l'ion Ca^{2+} du système de photolyse de l'eau. Par ce mécanisme, le Cu induit une inhibition du complexe de photolyse de l'eau et, par conséquent, il diminue l'efficacité photochimique du PSII (Lee *et al.*, 2007). Puisque le complexe de photolyse de l'eau et le système de transport d'électrons associés au PSII représentent des cibles principales de l'inhibition par les métaux, une altération du rendement photochimique du PSII est anticipée. Certains exemples des mécanismes de toxicité des métaux, étudiés par les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne, seront présentés dans les sections qui suivent.

La majorité des herbicides agissent directement sur l'activité photochimique du PSII en bloquant le transport d'électrons au niveau de l'accepteur secondaire du PSII, Q_B , associé à la protéine D1. Par conséquent, ils diminuent la formation de l'ATP et du NADPH et induisent des effets néfastes sur la croissance et le développement des plantes. Les herbicides de type phénylurés et les triazines vont bloquer l'oxydation de Q_A^- en se liant au site Q_B , empêchant son association avec la plastoquinone (Krieger-Liszkay et Rutherford, 1998; Ikeda *et al.*, 2003). Pour les plantes exposées à ces herbicides, et sous une illumination continue, le transport des électrons sera bloqué et Q_A restera dans un état réduit, favorisant ainsi la formation des espèces réactives de l'oxygène via la chlorophylle triplet (Rutherford et

Krieger-Liszkay, 2001; Fufezan *et al.*, 2002). On a démontré que l'herbicide de type phénolique, le dinitro-o-crésol, inhibe le transport d'électrons photosynthétiques dans deux sites. Le premier site d'inhibition est situé au niveau des protéines du complexe de photolyse de l'eau, et le deuxième au niveau de l'accepteur primaire Q_A du PSII (Pascal et Popovic, 1993).

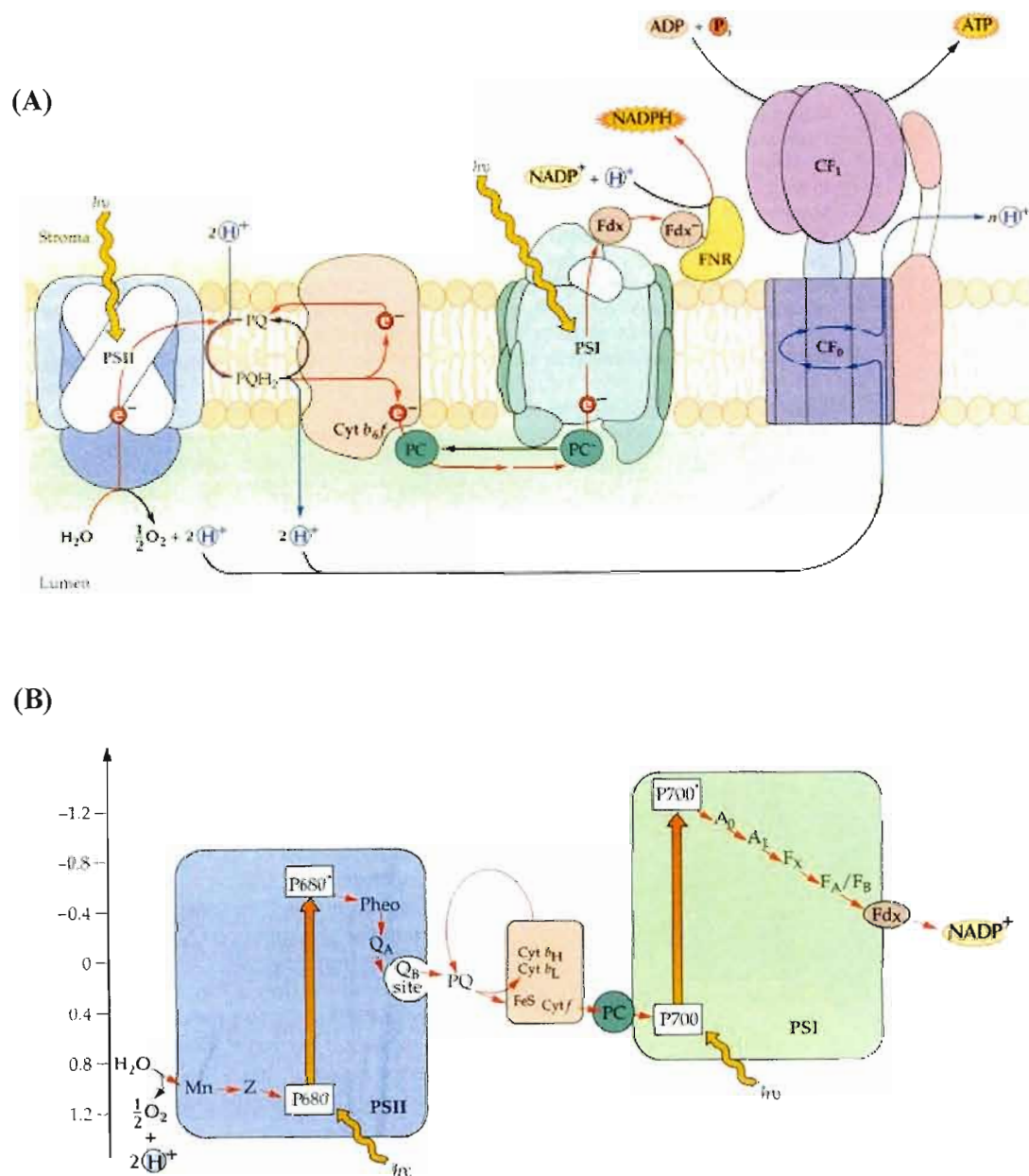


Figure 1.12 : (A) Disposition des transporteurs d'électrons dans la membrane de thylacoïde. Les complexes membranaires sont les photosystèmes II et I, le cytochrome b_6f , la plastocyanine et l'ATP synthétase. Les flèches indiquent le transfert des électrons (rouge) et la translocation de protons (bleu). (B) Schéma présentant le potentiel redox de chaque transporteur d'électrons dans la membrane de thylacoïde (d'après Malkin et Niyogi, 2000). Les abréviations utilisées sont indiquées p. xiv.

1.1.4 Structure et fonctionnement du photosystème I

Le photosystème I est constitué d'une vingtaine de polypeptides distribués entre le centre réactionnel (P700) et l'antenne collectrice de lumière (LHCI). Lorsque les antennes collectrices de lumière du PSI absorbent l'énergie lumineuse, le P700 passe à l'état excité P700*. Au niveau du PSI, la séparation de charges se fait (1-3ps) entre le P700* et une molécule de chlorophylle *a*, notée A₀. Le P700⁺ formé va ensuite récupérer un électron provenant de la plastocyanine (Jensen *et al.*, 2007). Les électrons reçus par la phylloquinone, A₁, sont ensuite transférés à la ferrédoxine (Fdx) en passant par les complexes protéiques fer-soufre (indiqués par F_X, F_A et F_B ; Figure 1.13 ; Malkin et Niyogi, 2000). La réduction de l'accepteur terminal d'électrons, le NADP⁺, en NADPH, est catalysée par la ferrédoxine NADP-réductase. Par la suite, le NADPH est utilisé comme réducteur pour la fixation du CO₂ et la synthèse des glucides pendant les réactions du cycle de Calvin (Raines, 2003). L'inhibition de l'activité du PSI par les métaux a été peu étudiée, comparativement à celle du PSII. Certaines études ont démontré que le Cd et le Hg empêchent la réduction du centre réactionnel P700⁺ par l'inhibition du transport d'électrons du côté donneur du PSI. Cette interaction du Hg et du Cd avec le P700 provoque une altération de tous les mécanismes de la réduction du P700⁺, incluant le transport linéaire et cyclique d'électrons (Sersen et Kralova, 2001; voir section 1.1.8.3 pour plus de détail sur le transport cyclique d'électrons). L'herbicide paraquat (méthyle viologen) a été caractérisé en tant qu'accepteur d'électrons du PSI, favorisant ainsi la formation excessive des espèces réactives de l'oxygène lorsqu'il transfère ses électrons à l'oxygène. Dans ces conditions, il induit une altération du polypeptide psaA du centre réactionnel du PSI, et du polypeptide D1 du centre réactionnel PSII (Kingston-Smith et Foyer, 2000).

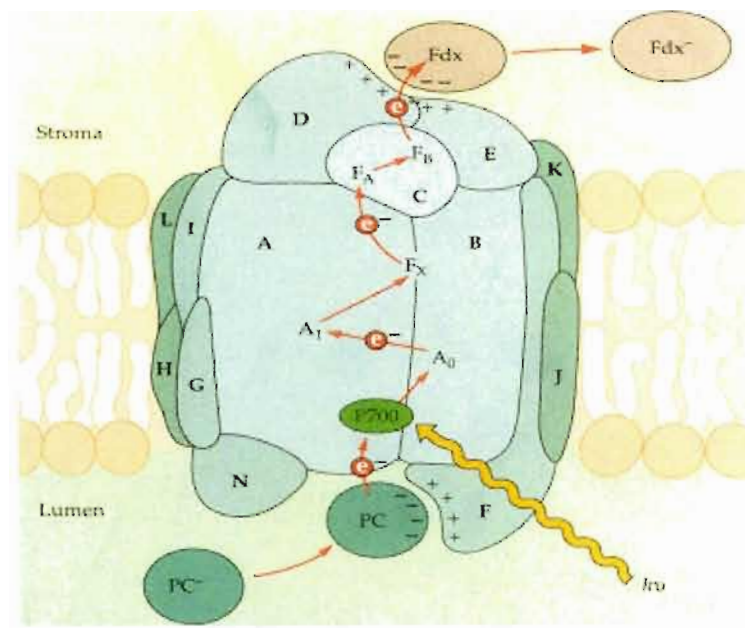


Figure 1.13 : Modèle structurel du photosystème I montrant l'organisation de ses différentes composantes protéiques (indiquées par des lettres ; Malkin et Niyogi, 2000).

1.1.5 La photophosphorylation

La réaction photochimique au niveau du PSII induit un transport d'électrons entre les photosystèmes II et I. Ce transport d'électrons forme un gradient transmembranaire de protons entre le *stroma* et le *lumen* du thylacoïde via la plastoquinone et le cytochrome b_6f . La réaction de photolyse de l'eau catalysée par le complexe de dégagement d'oxygène du PSII contribue également au gradient transmembranaire de protons. Ce gradient de protons induit la synthèse d'ATP par l'activité de l'ATP synthétase (ATP phosphohydrolase, EC 3.6.3.14), présente dans les lamelles du *stroma*. Cette enzyme est constituée de deux parties : la première (CF_0), hydrophobe, assure le passage des protons de l'intérieur vers l'extérieur du thylacoïde. La deuxième (CF_1), hydrophile, comprend les sites catalytiques nécessaires pour la synthèse de l'ATP à partir de l'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Figure 1.14 ; Allen, 2002; Nelson et Ben-Shem, 2004). Le fonctionnement de l'ATP

synthétase est régulé par le gradient de protons, et donc par l'état d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons entre le PSII et le PSI (Figure 1.15).

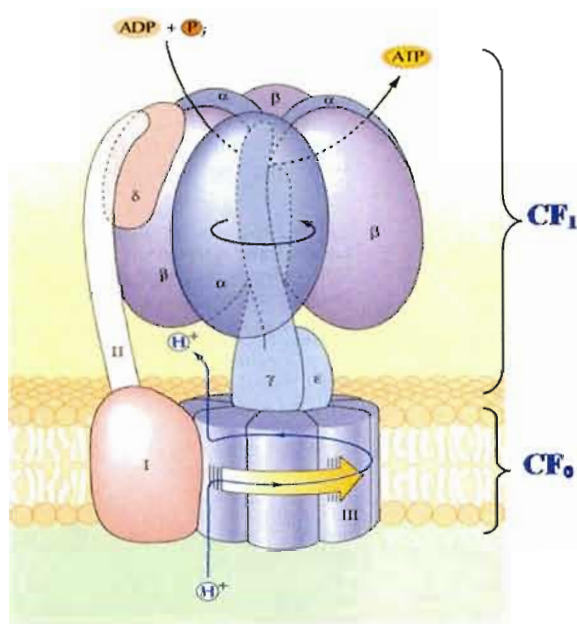


Figure 1.14 : Modèle de la structure moléculaire de l'ATP synthétase (ATP phosphohydrolase, EC 3.6.3.14). Le CF_1 se compose de cinq sous-unités polypeptidiques appelées α , β , γ , δ , ϵ . Le CF_0 est constitué de trois polypeptides, notés I, II et III (d'après Mallkin et Niyogi, 2000).

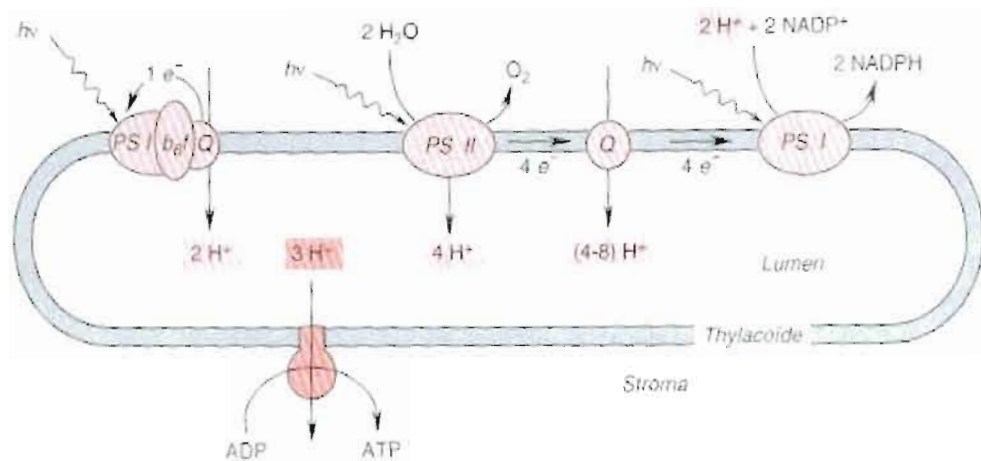


Figure 1.15 : Représentation schématique d'un thylacoïde, montrant le couplage "chimio-osmotique" entre le transport membranaire des électrons et la formation du gradient de protons transmembranaire permettant la synthèse de l'ATP (d'après Heller *et al.*, 1998). Les abréviations sont explicitées p. xiv.

1.1.6 La fixation du CO₂ et la synthèse de glucides

Pendant les réactions biochimiques de la photosynthèse, le CO₂ assimilé est incorporé en glucides dans le stroma du chloroplaste au cours du cycle de Calvin. Les réactions de ce cycle nécessitent l'ATP et le NADPH, eux-mêmes formés par le transport des électrons photosynthétiques. Le cycle de Calvin fonctionne en trois étapes successives (Figure 1.16) : la première étape consiste à la fixation du CO₂ pendant la carboxylation du ribulose 1,5-biphosphate via la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (Rubisco : 3-phospho-D-glycérate carboxy-lyase, EC 4.1.1.39). Cette réaction aboutit à la formation de 3-phosphoglycérate (PGA). Pendant la deuxième phase, le PGA est réduit en triose phosphate (3-phosphoglyceraldéhyde) qui sera exporté dans le cytosol pour la formation de sucrose. La dernière phase du cycle de Calvin comprend la régénération de la ribulose 1,5-bisphosphate (Martin *et al.*, 2000 ; Raines, 2003). En résumé, le bilan des réactions de réduction du carbone correspondant au cycle de Calvin est la formation d'un triose-phosphate. Au cours de ce cycle, 6 molécules d'ATP sont consommées lors de la phosphorylation du PGA ; trois

autres le sont aussi lors de la régénération du ribulose 1,5-biphosphate. La réaction globale pour synthétiser une molécule de sucre est :

$$6 \text{ CO}_2 + 12 \text{ H}_2\text{O} + \text{Énergie lumineuse} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + \text{Dissipation}$$

d'énergie sous forme de fluorescence et de chaleur

Les métaux comme le cadmium et le mercure peuvent également induire des effets toxiques au système cellulaire des plantes, via une détérioration des processus biochimiques reliés à la photosynthèse, comme le métabolisme du carbone dans le cycle de Calvin. Certaines preuves ont permis la démonstration que les réactions du cycle de Calvin peuvent être la cible de cadmium, ce qui affecte indirectement l'activité photochimique du PSII (Krupa *et al.*, 1993). Par exemple, le cadmium induit une altération de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase et également d'autres enzymes impliquées dans la photosynthèse, le cycle de Calvin et la biosynthèse de la chlorophylle. Cette altération est accompagnée d'une inhibition de la biosynthèse des acides gras, des acides aminés et des protéines ainsi que d'une altération de la croissance cellulaire (Gillet *et al.*, 2006).

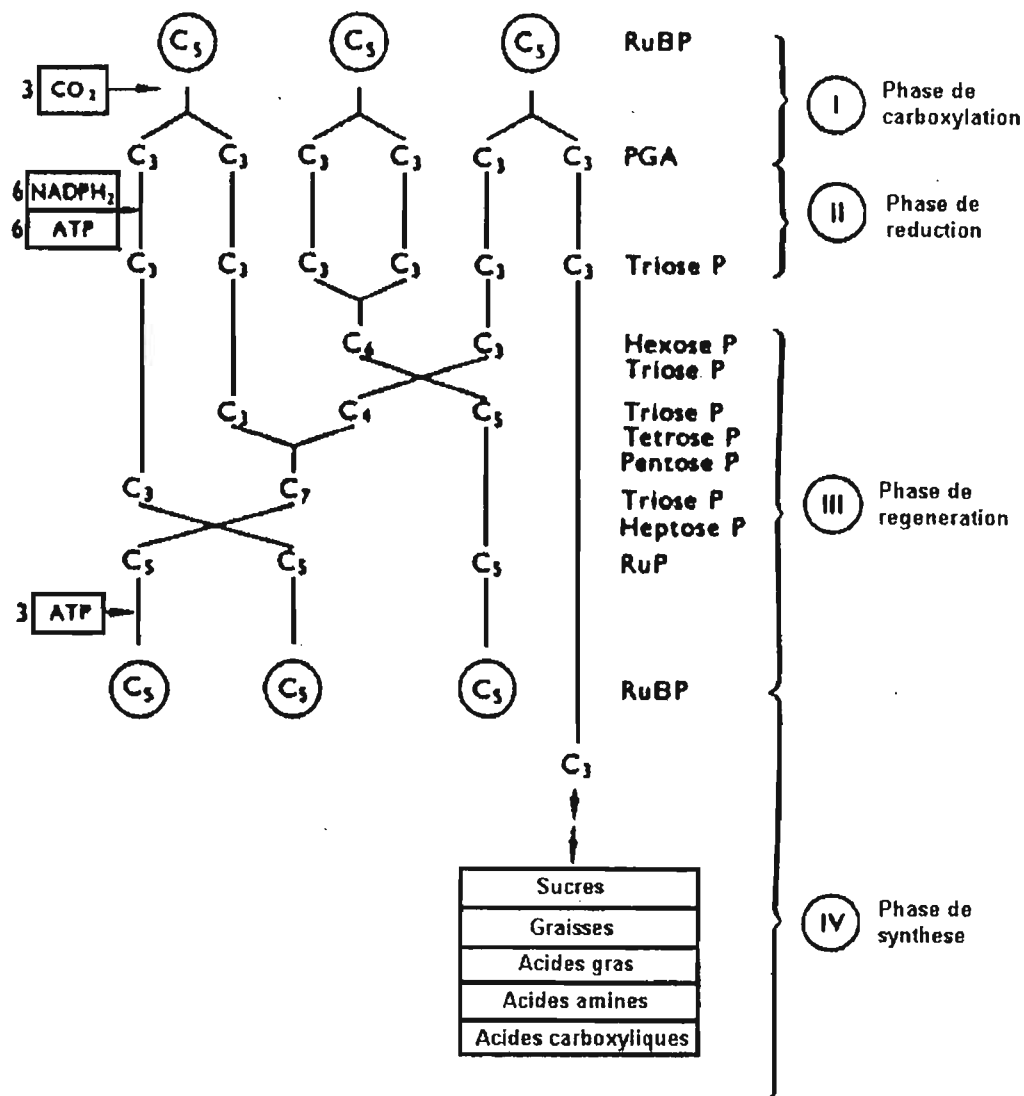


Figure 1.16 : Schéma représentant les réactions biochimiques de la fixation du CO₂ pendant le cycle de Calvin (d'après Hall et Rao, 1994).

1.1.7 La formation des espèces réactives de l'oxygène induisant un stress oxydatif

Dans la cellule végétale, la formation des espèces réactives d'oxygène (ERO) est contrôlée par le fonctionnement d'un système antioxydant constitué d'enzymes et de métabolites (Vichnevetskaia et Roy, 1999). La concentration cellulaire des ERO augmente suite à une exposition des plantes à des xénobiotiques inhibant le transport d'électrons dans

les chloroplastes et les mitochondries (Lichtenthaler, 1998; Prasad et Dietz, 1999; voir section 1.1.7.2 pour plus de détail). Dans ces conditions, les plantes exhibent des symptômes de stress oxydatif lorsque la formation des ERO dépasse les mécanismes de défenses antioxydantes de la cellule. Ce déséquilibre induit un dysfonctionnement de la physiologie cellulaire. Les ERO, ayant une grande réactivité envers les molécules organiques, vont détériorer les pigments photosynthétiques, les lipides, les protéines et l'ADN présents dans les différents organites et les membranes cellulaires (Asada, 1994). Les ERO interagissent avec les résidus acides aminés des protéines qui deviennent plus accessibles à la dégradation par les protéases. Dans le chloroplaste, la protéine D1, située au centre réactionnel du PSII, et celle de 33 kDa composant le système de photolyse de l'eau, sont souvent affectées par les ERO (Henmi *et al.*, 2004; Lupínková et Komenda 2004). Les enzymes du cycle de Calvin peuvent également subir des dommages oxydatifs causés par les ERO (Foyer et Noctor, 2000). Ces derniers induisent aussi une inhibition de la synthèse de la protéine D1, favorisant ainsi l'inhibition des mécanismes de réparation du PSII (Nishiyama *et al.*, 2006). Les ERO peuvent produire une dissociation des ions de manganèse à partir du système enzymatique de photolyse de l'eau, ce qui cause une inhibition de la réaction de photo-oxydation de l'eau (Song *et al.*, 2006).

1.1.7.1 Les espèces réactives de l'oxygène

À son état stable, la molécule d'oxygène est biradicalaire : elle possède sur sa couche électronique externe deux électrons célibataires de spin parallèle. Cette propriété rend l'O₂ non réactif avec les molécules organiques ayant des électrons appariés et de spin opposé. Cependant, les radicaux libres qui proviennent de l'oxygène, ont sur leur couche électronique externe un électron célibataire seulement ; en conséquence, ils possèdent une grande réactivité envers les molécules biologiques (McKersie et Leschem, 1994).

Les espèces réactives de l'oxygène comprennent des molécules à l'état excité, des hydroperoxydes et des espèces radicalaires (Tableau 1). L'activation de l'O₂ se fait soit par absorption d'énergie lumineuse, soit par acceptation d'électron. La première forme d'activation implique le transfert d'une énergie suffisante à l'O₂ pour inverser le spin de l'un de ces électrons. L'O₂ passe alors de son état stable (état triplet monovalent, ³O₂) à un état

excité singulet divalent ($^1\text{O}_2$). Cet état singulet est beaucoup plus réactif envers les molécules organiques que l'état triplet, car il pourra induire de nombreuses réactions d'oxydoréduction divalentes. Le second mécanisme d'activation de l'oxygène consiste en sa réduction par différents composés, y compris les métaux lourds (c'est-à-dire le Fe, le Cd, le Hg et le Cu) pour former des radicaux libres et des hydroperoxydes (Prasad et Dietz, 1999; Dat *et al.*, 2000).

Les métaux lourds comme le Cd, le Cu et le Cr induisent un stress oxydatif qui engendre la peroxydation des lipides, la chlorose des feuilles et la diminution de la croissance chez différentes espèces végétales (Drazkiewicz *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2005 ; Smeets *et al.*, 2005). Dans ces études, la formation des espèces réactives de l'oxygène, la peroxydation des lipides membranaires ou encore l'activité des enzymes antioxydatives, ont été utilisées comme marqueurs du stress oxydatif. La formation des ERO dans le système cellulaire peut être estimée par le test du diacétate de dihydrodichlorofluorescéine ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate). Ce réactif, après désacétylation intracellulaire, devient une sonde sensible aux ERO comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyl (Babu *et al.*, 2003).

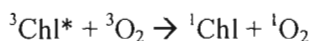
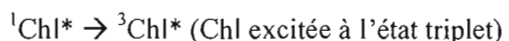
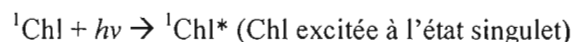
Tableau 1.1 : Nomenclature des différentes formes des espèces réactives de l'oxygène (Dat *et al.*, 2000).

Nom commun	Configuration électronique	Terminologie
Oxygène triplet (état stable)	$\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$	O_2
Oxygène singulet	$\text{O}-\text{O} :$	$^1\text{O}_2$
Radical superoxyde	$\cdot\text{O}-\text{O} :$	$\cdot\text{O}_2^-$
Radical hydroperoxyl	$\cdot\text{O}-\text{O} : \text{H}$	$\cdot\text{OOH}$
Peroxyde d'hydrogène	$\text{H} : \text{O}-\text{O} : \text{H}$	H_2O_2
Radical hydroxyl	$\text{H} : \text{O}\cdot$	$\cdot\text{OH}$
Ion hydroxyl	$\text{H} : \text{O} :$	OH^-

1.1.7.2 Site de formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

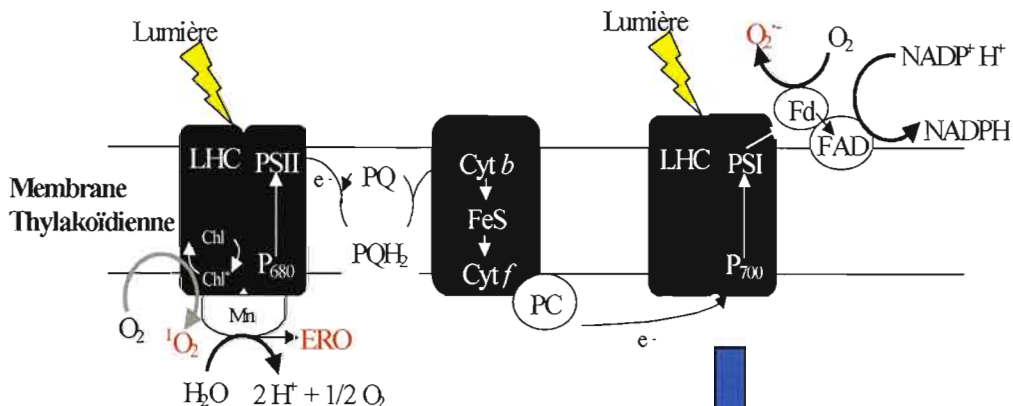
Dans la cellule végétale, les ERO sont formés dans les différents compartiments cellulaires : chloroplaste, mitochondrie, cytoplasme, peroxyosome et paroi cellulaire (Mittler, 2002). Pendant la respiration, dans la mitochondrie, l'oxygène est utilisé comme accepteur terminal d'électrons, ce qui permet la formation d'un gradient de protons nécessaire pour la synthèse d'ATP. Ce processus peut être altéré par les xénobiotiques, ce qui induit la formation des ERO (Dat *et al.*, 2000).

Dans les chloroplastes, les xénobiotiques peuvent induire une inhibition du transport d'électrons photosynthétiques, altérant ainsi les réactions photochimiques aux centres réactionnels des photosystèmes II et I. Dans de telles conditions, l'énergie d'excitation de la chlorophylle, à l'état triplet ($^3\text{Chl}^*$), non utilisée pour la réaction photochimique, peut être transmise à l'oxygène qui va alors former l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) selon les étapes suivantes :



Le PSII et le PSI représentent ainsi une source importante de la formation des ERO (Figure 1.17 ; Nishiyama *et al.*, 2006). Le PSII est connu pour contribuer aussi à la formation des ERO pendant la photolyse de l'eau. On sait également que la réduction de l'oxygène en ion superoxyde peut être induite par la ferrédoxine NADP⁺ réductase au niveau du PSI (Asada, 1994). Cette voie devient importante lorsque le cycle de Calvin est inhibé par les xénobiotiques. Dans ces conditions, peu de NADP⁺ est disponible et le PSI accumule des électrons qui vont induire la formation de l'ion superoxyde. Les photosystèmes constituent donc une source importante des ERO lorsqu'ils sont inactivés par les polluants ou autres stress environnementaux (Niyogi, 1999).

Stroma



Lumen

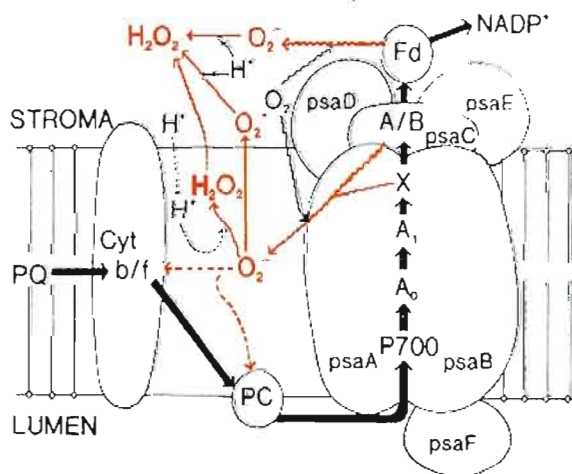


Figure 1.17 : Sites de formation d'ERO pendant la photosynthèse. (A) Pendant le transport des électrons entre le PSII et PSI. (B) Détails de la formation des ERO pendant le transport d'électrons au niveau du PSI (d'après Asada, 1994; McKersie et Leshem, 1994). NADP^+ et NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée et réduite, respectivement. FAD : flavin adénine dinucléotide; FNR : ferrédoxine NADP^+ réductase (EC 1.18.1.2). Les autres abréviations sont explicitées p. xiv.

1.1.8 Les mécanismes impliqués dans la régulation de transport d'électrons

Dans leur environnement naturel, les plantes sont souvent confrontées à une absorption excessive de l'énergie lumineuse. Ce processus est particulièrement accentué

lorsque la croissance des plantes est diminuée par les effets toxiques des xénobiotiques (métaux lourds et herbicides par exemple). Dans de telles conditions, l'activité photochimique du PSII est diminuée et l'accumulation d'énergie lumineuse en excès peut induire la formation des ERO de même qu'une photoinhibition (Figure 1.18 ; Niyogi, 1999). Lorsque l'intensité du stress induit par les xénobiotiques est faible, la plante peut néanmoins réguler son utilisation d'énergie lumineuse pour minimiser la formation des ERO.

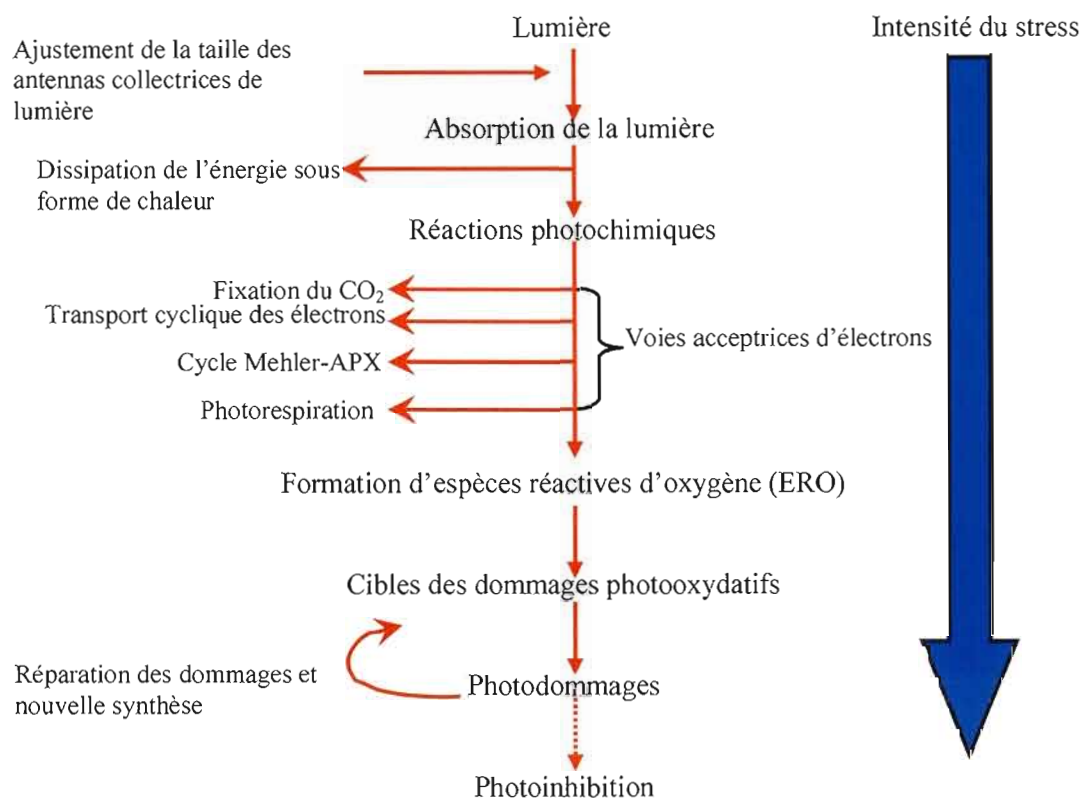


Figure 1.18 : Représentation schématique des processus de photoprotection et de régulation du transport des électrons photosynthétiques lorsque les chloroplastes sont exposés à un excès d'énergie lumineuse. APX : ascorbate peroxydase (d'après Niyogi, 1999).

Pour maintenir un fonctionnement optimal des photosystèmes et limiter la formation des ERO, la plante utilise des mécanismes de régulation pour gérer l'excès d'énergie lumineuse absorbée par les pigments photosynthétiques (Figure 1.18 ; Niyogi, 1999). Le

premier mécanisme est la distribution de la quantité d'énergie lumineuse absorbée par les photosystèmes via le processus des transitions entre les états I et II. L'énergie lumineuse en excès peut aussi être dissipée sous forme de chaleur avant la séparation de charge qui induit le transport d'électrons. Après la séparation de charge, et lorsque les électrons ne sont pas utilisés dans la fixation du CO₂, des accepteurs alternatifs d'électrons sont activés (transport cyclique des électrons et photorespiration par exemple). D'autre part, les ERO formés peuvent être éliminés par un système antioxydant permettant à la cellule de réparer les dommages. Cependant, lorsque la formation des ERO devient importante, le système antioxydant est saturé et les dommages produits ne seront pas réparés. On parle dans ce cas du processus de photoinhibition (Niyogi, 1999). Ces mécanismes de régulation sont résumés dans les paragraphes qui suivent.

1.1.8.1 Les transitions état I-état II

Pour réguler l'absorption de l'énergie lumineuse en fonction de leurs besoins, les plantes peuvent ajuster la taille des antennes collectrices de lumière par le processus des transitions entre les états I et II des photosystèmes. En effet, les PSII et PSI ont des spectres d'absorption différents et ils absorbent préférentiellement l'énergie lumineuse à des longueurs d'ondes spécifiques. En fonction de la qualité de la lumière reçue, l'activité de l'un des photosystèmes peut être favorisée par une lumière d'excitation ayant un maximum à 680 nm (pour le PSII) ou à 700 nm (pour le PSI ; Malkin et Niyogi, 2000). Dans de telles conditions, le PSII et le PSI, disposés en série, ne fonctionnent pas à la même vitesse, ce qui génère un déséquilibre entre le transport d'électrons et la distribution d'énergie lumineuse absorbée par les deux photosystèmes. Le processus des transitions entre les états I et II permet d'optimiser le transport d'électrons entre les deux photosystèmes par l'ajustement de la quantité de la lumière absorbée par le PSII et le PSI (Bellaïf *et al.*, 2005 ; Kanervo *et al.*, 2005).

L'état I est obtenu quand la taille des antennes LHCI du PSII est augmentée. L'inverse se produit à l'état II, c'est-à-dire que les LHCI du PSII diminuent et celles du PSI s'agrandissent. Cette régulation se fait par liaison réversible du LHCI au PSII et PSI et elle est contrôlée par la phosphorylation ou déphosphorylation des polypeptides Lhcb1 et Lhcb2

des antennes LHCIIs (Wollman, 2001). Lorsque le PSII fonctionne plus vite que le PSI, il favorise la réduction de la PQ et le rapport PQH_2/PQ va augmenter. Cette réduction de la PQ par le PSII va stimuler la kinase qui, en présence d'ATP et de Mg^{2+} , induit la phosphorylation du LHCII. La phosphorylation du LHCII par les groupes phosphates chargés négativement cause son détachement du PSII qui est aussi chargé négativement. Les LHCII phosphorylés migrent alors vers le PSI chargé positivement, augmentant ainsi la surface d'absorption de l'énergie lumineuse du PSI (Figure 1.19). La phosphorylation des LHCII cause aussi, par effet électrostatique, un désempilement des *grana* (Barber 1983 ; Nilsson *et al.*, 1997). L'oxydation du PQ par stimulation excessive de l'activité du PSI par rapport au PSII inverse ce processus (état I ; Bellafigore *et al.*, 2005). Ces arrangements permettent donc d'optimiser l'efficacité de la chaîne de transport d'électrons en fonction de la lumière reçue.

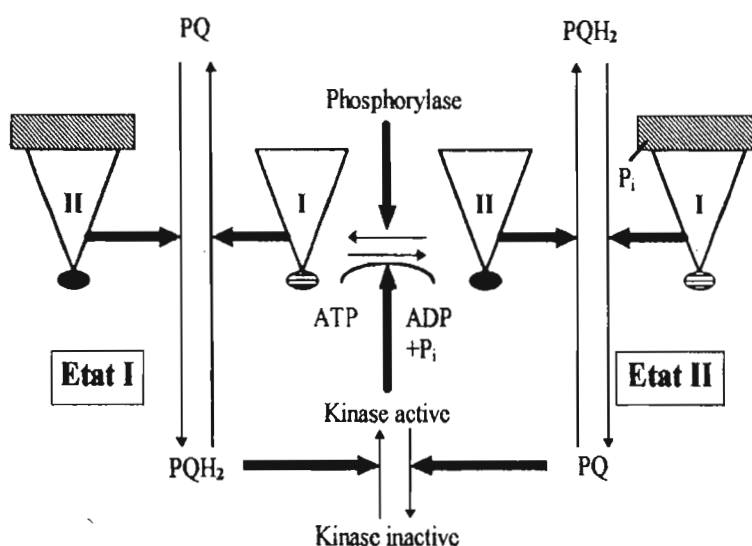


Figure 1.19 : Schéma de la régulation des changements d'état I et II par l'induction de la phosphorylation des LHCII par la kinase (Jupin et Lamant, 1999). Les abréviations sont indiquées p. xiv.

1.1.8.2 La dissipation sous forme de chaleur de l'excès d'énergie lumineuse absorbée

La dissipation d'énergie par les antennes du PSII, sous forme de chaleur, constitue la principale voie de dégagement de l'excès d'énergie lumineuse sous forme non dommageable

pour la cellule. Ce mécanisme assure la protection de l'appareil photosynthétique de deux façons (Niyogi, 1999 ; Müller *et al.*, 2000) : (1) il diminue la durée de vie de la chlorophylle singulet ($^1\text{Chl}^*$) en dissipant son énergie et minimise donc la formation de l'oxygène singulet au niveau du PSII, et (2) il minimise les possibilités de réduction de l' O_2 au niveau du PSI.

Les xanthophylles, associées avec les antennes (LHCII) du PSII, participent à la dissipation de l'excès d'énergie lumineuse selon une série de réactions reconnue comme « cycle des xanthophylles ». Ce processus est activé par un bas pH du lumen du thylacoïde lorsque le transport d'électrons transmembranaires est en excès (Figure 1.20 A ; Morosinotto *et al.*, 2003). Le fonctionnement du cycle des xanthophylles peut être résumé dans les étapes suivantes : lorsque les plantes sont exposées à une forte intensité lumineuse, l'acidification du lumen va briser la liaison LHCII/violaxanthine et activer la violaxanthine dé-époxydase (violaxanthine : ascorbate oxydoréductase, EC 1.10.99.3). Cette enzyme permet de convertir la violaxanthine en anthéroxanthine et zéaxanthine selon deux étapes successives. La zéaxanthine se lie ensuite aux complexes protéiques du PSII, permettant la désactivation des molécules de chlorophylle excitées (singulet et triplet) en dissipant leur énergie sous forme de chaleur. Ce mécanisme s'accompagne d'un changement de conformation protéique du PSII — induit par la protonation de la protéine PsbS et la liaison de la zéaxanthine au LHCII —, favorisant ainsi la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur (Figures 1.20 et 1.21 ; Horton *et al.*, 2005). La zéaxanthine est convertie en violaxanthine par la zéaxanthine époxydase (zéaxanthine, NAD(P)H : oxygène oxydoréductase, EC 1.14.13. 90) selon deux réactions successives. En dehors du cycle des xanthophylles, la zéaxanthine peut être présente sous forme libre dans les membranes du thylacoïde. Dans ce cas, elle semble être impliquée dans la protection des membranes en diminuant la peroxydation des lipides membranaires et en neutralisant les ERO (Morosinotto *et al.*, 2003). Certains xénobiotiques, comme l'herbicide norflurazon, inhibent la synthèse de caroténoïdes, altérant ainsi le système de protection des cellules contre la formation des ERO. Ceci provoque une photooxydation et des altérations des complexes pigments-protéines du LHCII et du centre réactionnel du PSII sous illumination (Guseinova *et al.*, 2005).

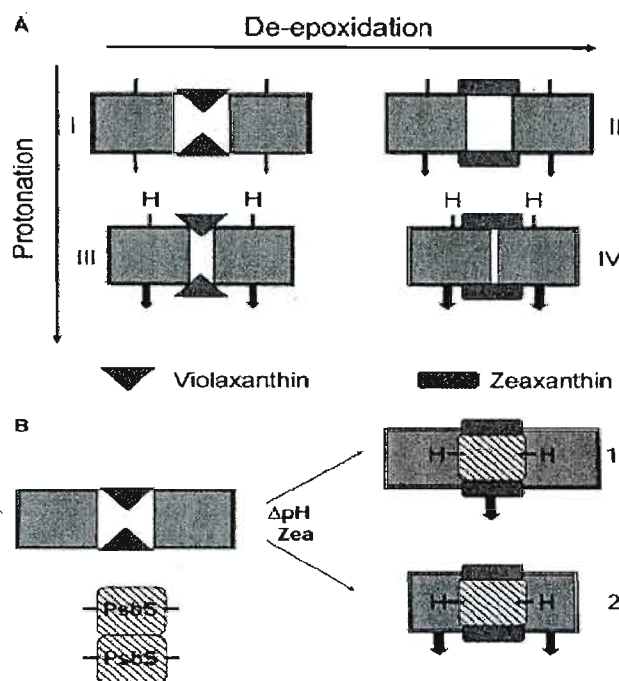


Figure 1.21 : (A) Modèle de changement de la conformation des antennes collectrices de lumière (LHCII) du PSII, permettant la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. L'état I est observé quand le PSII est adapté à l'obscurité. Les états III et IV sont observés respectivement immédiatement et après plusieurs minutes d'exposition du PSII à une forte intensité lumineuse. L'état II est obtenu après quelques minutes d'adaptation à l'obscurité chez le PSII préalablement exposé à la lumière. Dans chaque état, la grandeur des flèches représente la dissipation d'énergie via la chaleur. (B) Les mécanismes d'action de la protéine PsbS du PSII. Le premier implique une protonation de la PsbS qui lie la zéaxanthine et participe directement à la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur. Dans le deuxième mécanisme, la PsbS catalyse le changement de la conformation des LHCII durant le passage du PSII de l'état I à III et de l'état II à IV (Horton *et al.*, 2005).

1.1.8.3 Le transport cyclique des électrons

Lorsque les réactions biochimiques constituant le cycle de Calvin sont inhibées par les xénobiotiques ou d'autres conditions de stress physiologique, le $NADP^+$, utilisé comme accepteur terminal d'électrons photosynthétiques, devient peu disponible. Par conséquent, les électrons accumulés au niveau du PSI peuvent être transférés à l'oxygène qui va générer des espèces réactives de l'oxygène. Pour limiter ce transfert, l'appareil photosynthétique peut effectuer un transport cyclique des électrons qui n'implique pas le PSII (Golding et Johnson,

2003). De ce fait, il n'y a pas de formation d' O_2 ni de transfert des électrons sur le $NADP^+$. Dans ce processus, seul le photosystème I, la ferrédoxine-plastoquinone (Fdx-PQ) oxydoréductase et le cytochrome b_6f participent au transport cyclique des électrons (Figure 1.22). Après sa réduction par le PSI, la ferrédoxine (Fdx) transfère son électron à la ferrédoxine-plastoquinone oxydoréductase qui réduit ensuite le complexe plastoquinone-cytochrome b_6f (Malkin et Niyogi, 2000). Ce transport cyclique des électrons a pour effet d'augmenter le gradient de protons dans le lumen du thylacoïde. Ce gradient de pH permet ensuite la synthèse d'ATP de même que la dissipation, sous forme de chaleur, de l'énergie lumineuse en excès au niveau du PSII (Niyogi, 1999).

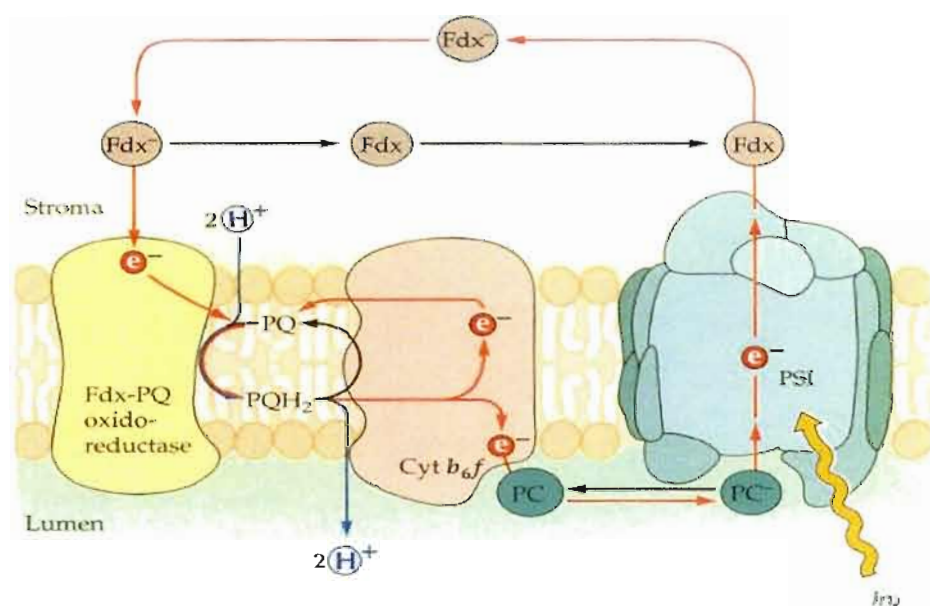


Figure 1.22 : Transport cyclique des électrons s'effectuant entre le PSI, la ferrédoxine-plastoquinone (Fdx-PQ) oxydoréductase et le cytochrome b_6f dans la membrane du thylacoïde (d'après Malkin et Niyogi, 2000). Les abréviations sont explicitées p. xiv.

1.2 LA CINÉTIQUE DE LA FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE COMME INDICATEUR DES RÉACTIONS PHOTOCIMIQUES ET DU TRANSPORT DES ÉLECTRONS PHOTOSYNTHÉTIQUES

L'énergie lumineuse absorbée par les pigments photosynthétiques n'est pas toute utilisée par les réactions photochimiques. Une partie de cette énergie est dissipée sous forme de chaleur et de fluorescence. Lorsqu'une molécule de chlorophylle reçoit un photon, elle passe d'un état stable à l'état instable (état singulet), ce dernier ayant un niveau d'énergie plus élevé. Cette forme de chlorophylle revient à son état stable (niveau d'énergie faible) en 3 façons différentes (Stroch *et al.*, 2004) : elle peut soit transférer l'énergie d'excitation à une molécule de chlorophylle voisine (ou à l'O₂ qui forme l'oxygène singulet), soit dissiper cette énergie sous forme de chaleur, soit émettre un photon sous forme de fluorescence (Figure 1.23). Cette fluorescence, provenant en majorité de la chlorophylle *a* des antennes du PSII, semble varier dans le temps. En effet, Kautsky et Hirsh (1931) furent les premiers à découvrir que la fluorescence de la chlorophylle présentait une variation dans le temps lorsqu'une plante (ou des algues) était illuminée en continu après adaptation à l'obscurité. Cette cinétique de fluorescence variable désignée jusqu'à aujourd'hui sous « l'effet Kautsky », peut être classée en cinétique rapide (1 sec environ) et lente (plusieurs minutes). Actuellement, il est bien connu que le rendement de la fluorescence de la chlorophylle *a* dépend de l'état d'oxydoréduction de l'accepteur primaire des électrons du PSII, le Q_A. Le rendement de la fluorescence augmente quand Q_A se réduit et diminue quand Q_A se ré-oxyde (Lázár, 1999).

La mesure de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne est devenue un outil important pour analyser au niveau moléculaire l'état des réactions photochimiques du PSII et du transport des électrons entre le PSII et le PSI. Lorsque l'énergie d'excitation n'est pas suffisante pour induire la séparation de charge, le centre réactionnel du PSII reste ouvert, c'est-à-dire que Q_A reste à l'état oxydé. Dans cet état, la fluorescence de base, F₀, est émise en majorité par les antennes de chlorophylle *a* du PSII, mais aussi par une faible contribution du PSI (d'environ 20 % chez les plantes C₃ ; Pfundel, 1998). Lorsque l'énergie d'excitation atteignant le centre réactionnel du PSII est assez élevée, la séparation de charges s'effectue, induisant une réduction de Q_A et un transport d'électrons entre le PSII et le PSI. Dans ce cas, le rendement de la fluorescence variable (F_v), émise par les antennes du PSII, dépendra de

l'état d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons entre le PSII et le PSI (Figure 1.24). Le rendement de la fluorescence maximal (F_M) est obtenu quand tous les Q_A sont réduits en présence d'une lumière saturante. À ce niveau, la capacité photochimique du PSII atteint son maximum. Ainsi, la fluorescence peut-elle être utilisée pour étudier les processus de transfert de l'énergie lumineuse, l'efficacité des réactions photochimiques du PSII et le transport des électrons, qui sont interdépendants avec les autres processus biochimiques ou physiologiques liés à la photosynthèse (Lazár, 1999 ; 2006 ; Krause et Jahns, 2003). Actuellement, l'utilisation du PAM (*Pulse Amplitude Modulated*) et du PEA (*Plant Efficiency Analyser*) permet de mesurer *in vivo* l'activité photosynthétique et les processus qui lui sont liés.

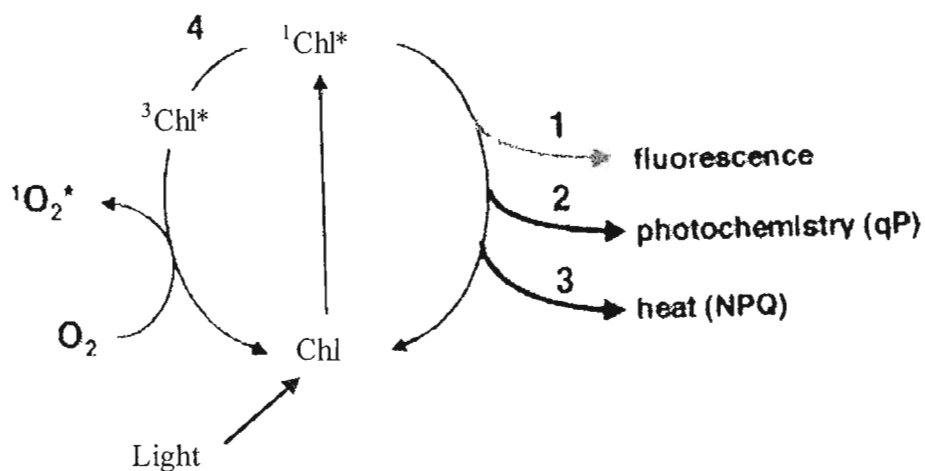


Figure 1.23 : Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée (d'après Müller *et al.*, 2001). ¹Chl* et ³Chl* : molécule de la chlorophylle excitée à l'état singulet et triplet, respectivement.

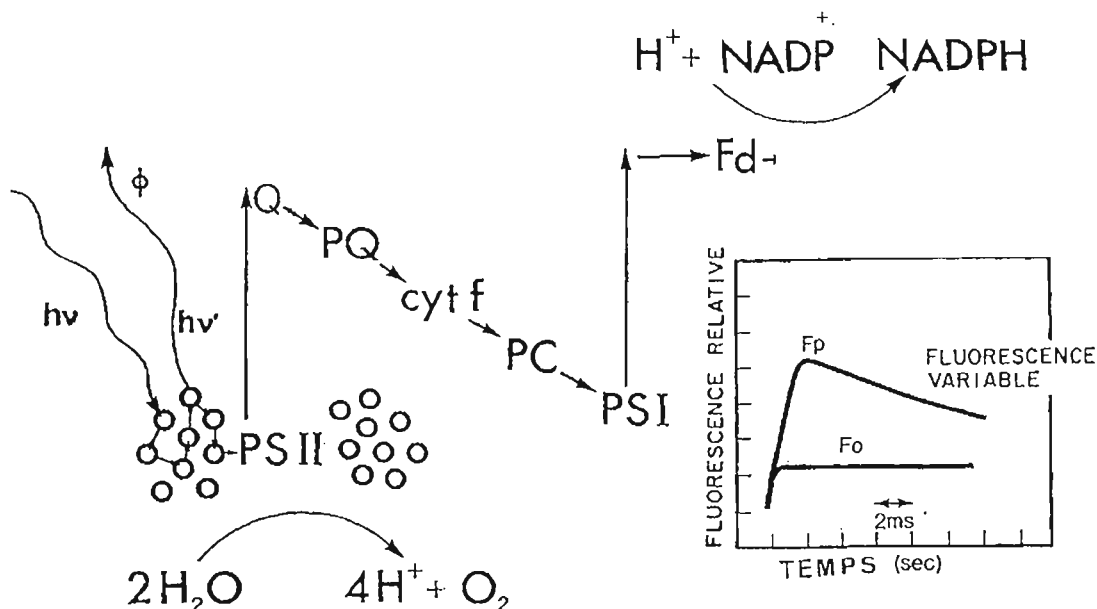


Figure 1.24 : Relation entre le transport d'électrons et l'émission de la fluorescence chlorophyllienne au niveau du PSII. Q : quinone A et quinone B ; PQ : plastoquinone ; Cyt f : cytochrome b₆F ; NADP⁺ et NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée et réduite, respectivement ; PC : plastocyanine ; Fd : ferrédoxine. Fo et Fp: niveau de fluorescence quand les Q_A sont à l'état oxydé et réduit, respectivement.

1.2.1 La cinétique rapide et polyphasique

La cinétique rapide et polyphasique de la fluorescence chlorophyllienne est mesurée par la méthode fluorimétrique du *Plant Efficiency Analyser* (PEA). Cette méthode permet d'analyser et d'interpréter l'état de transport d'électrons du PSII et de la photolyse de l'eau (Strasser, 1997 ; Lazár, 1999 ; 2006). La cinétique rapide de la fluorescence est obtenue lorsqu'un échantillon adapté à l'obscurité (environ 30 min) est exposé à un flash de lumière saturante pendant 1 à 6 secondes. Quand elle est présentée sur une échelle logarithmique, cette cinétique montre plusieurs transitions : O, J, I et P, qui indiquent différents états d'oxydoréduction des accepteurs d'électrons du PSII, Q_A, Q_B et plastoquinones (Figure 1.25). Le niveau de fluorescence Fo à la transition O est déterminé après environ 50 μsec d'illumination (Strasser *et al.*, 1995). Il reflète la fluorescence émise quand les centres réactionnels sont « ouverts », avant que l'énergie d'excitation ne soit expédiée au centre

réactionnel du PSII, c'est-à-dire quand les Q_A sont à l'état oxydé (Strasser et Stirbet, 2001). Les phases intermédiaires de la cinétique (O-J et J-I-P) indiquent les états d'oxydoréduction de Q_A , Q_B . Il a été démontré que la phase O-J représente les réactions photochimiques primaires du PSII car elle correspond à une réduction progressive de Q_A et donc à la fermeture graduelle des centres réactionnels du PSII (Neubauer et Schreiber, 1987). Le niveau de fluorescence à la transition J peut représenter le maximum de réduction de Q_A , dans les conditions où l'accepteur d'électrons Q_B est limitant. Cette phase photochimique, O-J, peut aussi subir des changements liés aux états de transition S du complexe de dégagement d'oxygène (Hsu, 1993). L'inhibition du complexe de photolyse de l'eau, par exposition des plantes à une température élevée ou à la sécheresse, provoque l'apparition d'une transition additionnelle, notée K, située (à 300 μ s) entre O et J (Guissé *et al.*, 1995 ; Srivastava *et al.*, 1997). Le niveau de fluorescence, à la transition I (située à 30 ms), correspond à une réduction de Q_B et à l'accumulation de $Q_A^-Q_B^-$ (Strasser *et al.*, 1995). Après la transition I, le niveau de fluorescence montre, dans un premier temps, un plateau appelé « *D dip* » qui indiquerait une régulation du transport d'électrons entre le PSII et le PSI (Hansen *et al.*, 1991). Ensuite, l'augmentation de la fluorescence, jusqu'à la transition P (phase I-P), reflète une accumulation progressive de $Q_A^-Q_B^{2-}$ (Strasser et Govindjee, 1991). Le niveau maximum de fluorescence est atteint quand tous les Q_A sont réduits ainsi que le pool de PQ (Vredenberg, 2000). La diminution lente de la fluorescence après la transition P dépendra de la vitesse de ré-oxydation lorsque les électrons sont transférés au PSI, et l'ATP et le NADPH sont utilisés pour la fixation du CO_2 pendant le cycle de Calvin (Walker, 1981 ; Krause et Weis, 1991). Cette diminution de la fluorescence est aussi influencée par la formation du gradient de protons transmembranaire, qui induit la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (Govindjee et Spilotro, 2002).

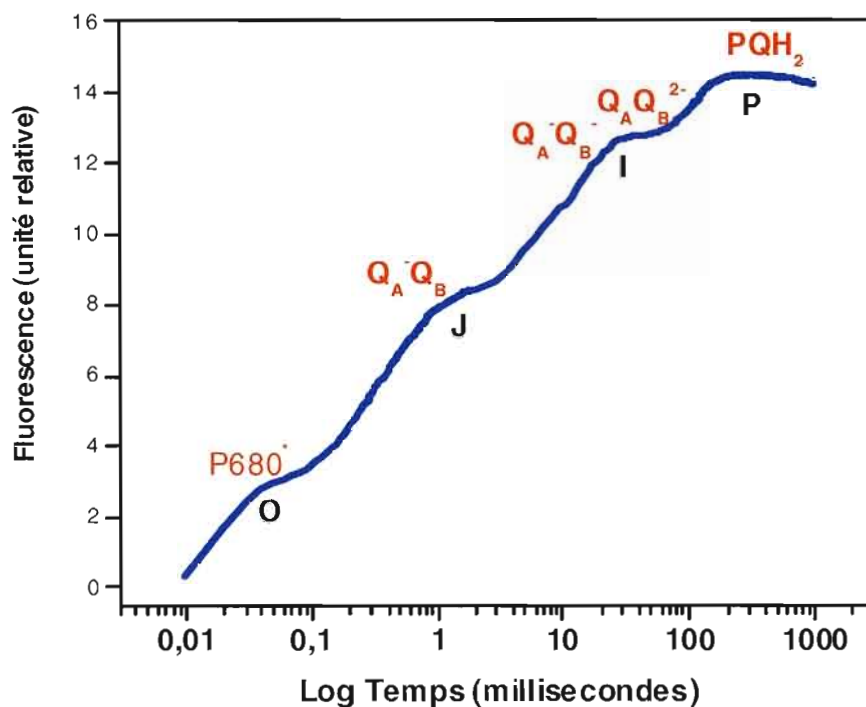


Figure 1.25 : Courbe d'induction de fluorescence montrant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique. Q_A et Q_B : accepteurs primaire et secondaire du PSII; PQH_2 : Plastoquinone réduite (d'après Strasser *et al.*, 1995).

1.2.2 Les paramètres photosynthétiques estimés par la cinétique rapide et leur signification physiologique

La mesure de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne permet d'estimer plusieurs paramètres photosynthétiques associés à l'activité photochimique et non photochimique du PSII. Pour ces paramètres, le niveau de fluorescence maximal, F_M , a été déterminé à la transition P, et le niveau de fluorescence variable aux transitions O, K, J et I est estimé à 50 μs , 300 μs , 2 et 30 ms, respectivement. Dans le projet de recherche de cette thèse, les paramètres détaillés ci-après ont été utilisés.

Le rendement des réactions photochimiques primaires du photosystème II est estimé par le ratio suivant : $\phi_{p_o} = F_M - F_{50\mu s} / F_M = F_v / F_M$ (Strasser et Strasser, 1995). Pour ce paramètre, $F_{50\mu s}$ représente le niveau de fluorescence de base à 50 μs (à la transition O)

lorsque les centres réactionnels du PSII sont ouverts, et F_M le niveau de fluorescence maximal (à la transition P) quand les centres réactionnels du PSII sont fermés. Dans les conditions physiologiques optimales, le ϕp_o , mesuré après adaptation à l'obscurité, a une valeur d'environ 0,832 pour des plantes supérieures (Björkman et Demmig, 1987). La diminution de ce paramètre peut être une indication des dommages induits par les xénobiotiques ou d'autres stress environnementaux.

L'absorption de l'énergie lumineuse, via les antennes collectrices de lumière par le centre réactionnel fonctionnel du PSII, a été estimée par le ratio : $ABS/RC = M_0/V_J / \phi p_o$ (Force *et al.*, 2003). Le paramètre M_0 représente la vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable, dépendant du centre réactionnel du PSII, selon l'équation : $M_0 = F_{300\mu s} - F_{50\mu s} / (F_M - F_{50\mu s}) \times 0.25$ où $F_{300\mu s}$ et $F_{50\mu s}$ représentent le niveau de fluorescence à 300 et 50 μs , respectivement. Le paramètre V_J représente la fluorescence variable dépendante de la réduction de Q_A selon l'équation : $V_J = F_{2ms} - F_{50\mu s} / F_M - F_{50\mu s}$. Le F_{2ms} représente le niveau de fluorescence à 2 ms (à la transition J).

Le paramètre ABS/RC permet une estimation du nombre de photons absorbés par les antennes collectrices de lumière (LHCII) par rapport aux centres réactionnels fonctionnels du PSII. Il indique donc la taille des LHCII par centre réactionnel fonctionnel du PSII (Strasser *et al.*, 1999). Il a été postulé que le changement du paramètre ABS/RC peut être causé par une modification de la taille des LHCII associées au PSII. Cependant, l'augmentation de ce paramètre, lorsque *Spirodela polyrhiza* est exposée au chrome, a été interprétée par une diminution du nombre des centres réactionnels du PSII en état fonctionnel (Appenroth *et al.*, 2001). Chez les algues *Scenedesmus obliquus*, la taille des antennes collectrices de lumière du PSII, estimée par ABS/RC , était le paramètre le plus sensible pour évaluer l'effet de l'inhibition du photosystème II par l'oxyfluorène (Geoffroy *et al.*, 2003).

Une partie de l'énergie lumineuse absorbée par les LHCII est transférée au centre réactionnel du PSII pour induire la séparation de charge. Dans ce cas, la proportion de photons utilisés pour la réduction de Q_A est évaluée par le paramètre : $TR_0/RC = M_0/V_J$, qui caractérise le piégeage de photons (*trapping*) dans le centre réactionnel du PSII. Par ailleurs, le transfert des électrons à la chaîne de transport d'électrons au delà de Q_A peut être estimée

par le paramètre : $ET_0/RC = (M_0/V_J) \times (1-V_J)$. Le paramètre ET_0/RC représente le transport d'électrons par centre réactionnel du PSII, et il estime donc la réoxydation du Q_A par transfert des électrons dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétique (Force *et al.*, 2003).

L'énergie lumineuse absorbée par les LHCII, et non utilisée pour le transport d'électrons, est dissipée sous forme de chaleur. Ainsi, la dissipation d'énergie sous forme non photochimique par centre réactionnel du PSII est-elle déterminée par le calcul suivant : $DI_0/RC = (ABS/RC - (M_0/V_J))$. Ce paramètre caractérise la fraction de l'énergie lumineuse dissipée via la chaleur par centre réactionnel du PSII en état fonctionnel (Strasser *et al.*, 2000).

Les xénobiotiques, en inhibant le transport d'électrons photosynthétiques, peuvent induire une diminution du nombre de centres réactionnels du PSII en état fonctionnel. La proportion des centres réactionnels du PSII en état fonctionnel par surface foliaire peut être estimée par l'équation : $RC/CS = F_M \times \phi_{p_0} \times V_J/M_0$ (Strasser *et al.*, 2004).

Le changement de ces paramètres ABS/RC , TR_0/RC , ET_0/RC et DI_0/RC , lorsque les plantes sont exposées aux xénobiotiques ou à d'autres stress environnementaux, peut être visualisé par le modèle fonctionnel du PSII au niveau de la membrane thylacoïdale, illustré par la Figure 1.26 (Krüger *et al.*, 1997 ; Appenroth *et al.*, 2001).

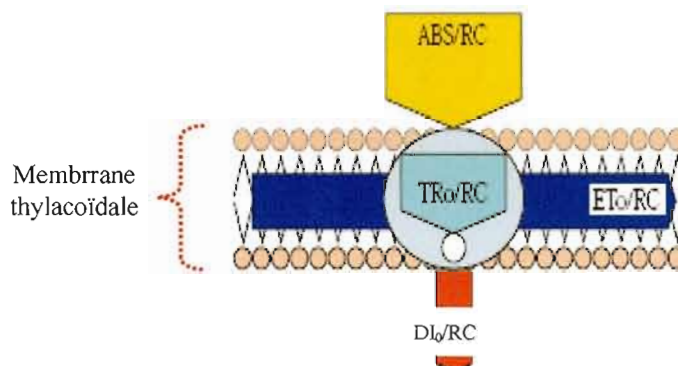


Figure 1.26 : Modèle de la membrane thylacoïdale indiquant les différents paramètres photosynthétiques qui caractérisent le fonctionnement du PSII. La largeur des flèches est proportionnelle aux flux d'énergie lumineuse absorbée par les LHCII (d'après Zrýd *et al.*, 2002). Les abréviations sont explicitées pp. 46-47.

1.2.3 La cinétique lente de la fluorescence chlorophyllienne

La méthode de *Pulse Amplitude Modulation* (PAM) a été développée pour mesurer la cinétique lente de la fluorescence chlorophyllienne, qui permet l'analyse de la dépendance entre le rendement de la fluorescence et les fonctions photosynthétiques (Schreiber *et al.*, 1986 ; Schreiber, 2004). Cette méthode nécessite l'utilisation de quatre types de source lumineuse (modulée, actinique, saturante et rouge lointain) qui permettent de mesurer la cinétique de fluorescence de la chlorophylle *a* pendant les différents états de la photosynthèse (Figure 1.27). Après adaptation à l'obscurité, la plante est exposée à une lumière modulée (594 nm) de faible intensité pour ne pas induire la séparation de charges. Dans cet état, la fluorescence de base (F_o) mesurée représente la dissipation d'énergie par les antennes collectrices avant que l'énergie d'excitation ne soit transférée aux centres réactionnels du PSII (l'accepteur primaire d'électrons du PSII, Q_A est donc oxydé). Dans ces conditions, les centres réactionnels du PSII sont tous à l'état ouvert. Le niveau maximal de fluorescence (F_M) est obtenu par un flash de lumière saturante (400-700 nm) de 800 ms, qui provoque la réduction de tous les Q_A et la fermeture de tous les centres réactionnels du PSII (Govindjee, 1995). L'exposition des plantes à la lumière actinique (400-700 nm) va initier le transport d'électrons entre le PSII et le PSI de même que les autres processus photosynthétiques. Simultanément, le niveau de fluorescence maximal (F'_M) est obtenu en utilisant des flashes

périodiques de lumière saturante, toutes les 40 secondes. La fluorescence induite par la lumière actinique, à l'état stationnaire du transport d'électrons, permet d'évaluer la proportion de centres réactionnels fermés. La fluorescence variable (F_v), induite par les flashes de lumière saturante à l'état stable de fluorescence F_s , correspond à l'activité fonctionnelle du PSII. À l'état stationnaire du transport d'électrons, la lumière actinique est fermée et la lumière dans le rouge lointain (à 735 nm, excitant le PSI en particulier) est utilisée pour estimer le niveau de fluorescence F_o . Ce niveau indique l'état dans lequel les centres réactionnels du PSII sont ouverts (Figure 1.27). Cette combinaison de lumières permet l'analyse du rendement photochimique du PSII ainsi que celle de la dissipation d'énergie sous forme non photochimique (Rohacek, 2002 ; Krause et Jahns, 2004). Le phénomène de « *quenching* » correspond à une atténuation de la fluorescence qui peut être liée à la dissipation d'énergie par des réactions non photochimiques (Rohacek et Bartak, 1999).

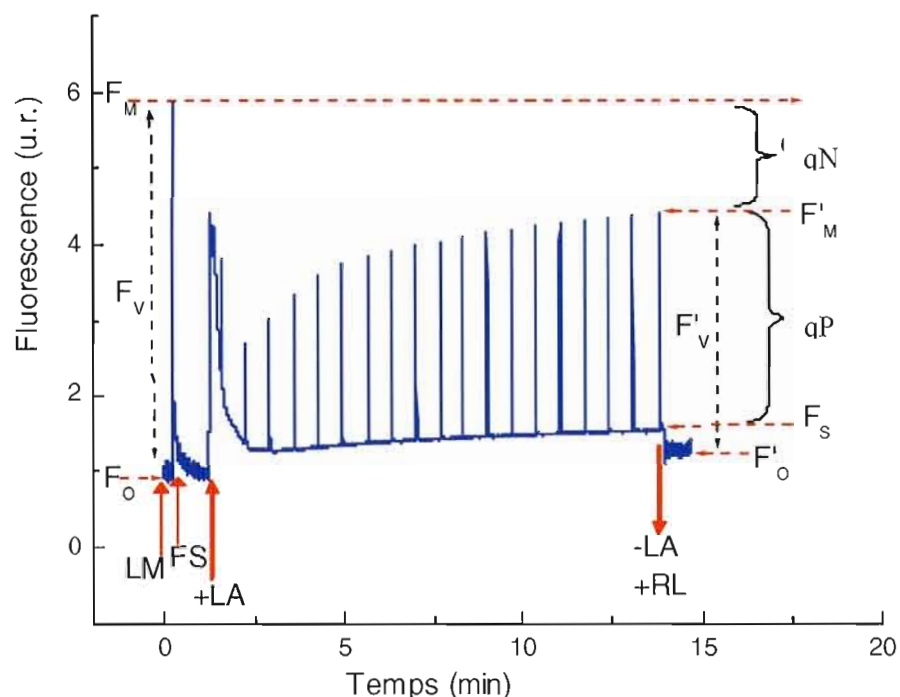


Figure 1.27 : Cinétique de fluorescence modulée mesurée à l'aide d'un fluorimètre PAM. Abréviations : F_o : fluorescence constante pour une plante adaptée à l'obscurité; F'_o : fluorescence constante pour une plante adaptée à la lumière; F_v : fluorescence variable; F_M : fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité; F'_M : fluorescence maximale pour une plante adaptée à la lumière; qN : *quenching* non photochimique; qP : *quenching* photochimique; LM : lumière modulée; FS : flash de lumière saturante; LA : lumière actinique; RL : lumière dans le rouge lointain (d'après Rohacek et Bartak, 1999).

1.2.4 Les paramètres photosynthétiques de la cinétique lente de fluorescence

La cinétique PAM de fluorescence de la chlorophylle *a*, mesurée sur des échantillons adaptés à l'obscurité, permet d'estimer différents paramètres photosynthétiques qui reflètent l'état d'oxydoréduction de transporteurs des électrons associés au PSII-PSI de même que la dissipation d'énergie sous forme non photochimique. Le protocole de mesure de la cinétique de fluorescence utilisé pour déterminer les paramètres a été précédemment décrit. Ces paramètres peuvent être utilisés pour évaluer l'état physiologique des plantes quand elles sont exposées à un stress dû à des xénobiotiques (Van Kooten et Snel, 1990). Dans les

paragaphes suivants, nous présentons les paramètres de fluorescence qui ont été utilisés dans les travaux de cette thèse.

Pour une plante adaptée à l'obscurité, tous les centres réactionnels du PSII sont à l'état ouvert (Q_A oxydé). Dans ces conditions, son exposition à un flash de lumière saturante permet d'obtenir le niveau maximal de fluorescence (F_M). En utilisant F_0 obtenu auparavant sous lumière modulée, la fluorescence variable indique la proportion des centres réactionnels du PSII à l'état réduit : $F_V = F_M - F_0$ (Rohacek, 2002). Par la suite, le rendement photochimique maximal du PSII (ϕ_M) est évalué par : $\phi_M = (F_M - F_0) / F_M = F_V / F_M$ (Rohacek et Bartak, 1999). F_0 représente le niveau de fluorescence basal lorsque les accepteurs primaires d'électrons, Q_A sont à l'état oxydé. F_M représente le niveau maximal de fluorescence quand les Q_A sont complètement réduits. Le paramètre ϕ_M représente donc le rendement quantique du transfert des électrons du P680 à l'accepteur primaire Q_A , ce qui reflète l'efficacité photosynthétique de la plante (Butler et Kitajima, 1975).

Lorsqu'une plante est adaptée à la lumière, une partie des centres réactionnels du PSII sont fermés (Q_A réduit), ceci en fonction de l'intensité lumineuse. Le rendement photochimique du PSII devient alors dépendant de l'efficacité de transfert des électrons entre le P680 et le Q_A . L'état stationnaire de transport d'électrons représente un état d'équilibre dans les processus de régulation du transport d'électrons entre le PSII et le PSI. Lorsque cet état est atteint, le F_S représente le niveau de fluorescence sous illumination actinique, indiquant la proportion des centres réactionnels du PSII ne participant pas au transport d'électrons (Rohacek et Bartak, 1999). Dans ces conditions, le niveau F'_M induit par les flashes de lumière saturante représente le rendement maximal de fluorescence causé par la fermeture des PSII qui participent au transport d'électrons. Par conséquent, la valeur $F'_M - F_S$ indiquera la proportion des centres réactionnels du PSII participant au transport d'électrons via PSII au PSI (Rohacek et Bartak, 1999). Lorsque la lumière actinique est fermée, le niveau F'_0 est obtenu sous éclairage rouge lointain, permettant la stimulation spécifique du PSI, et donc l'oxydation du pool de plastoquinone. Ce niveau représente le rendement de fluorescence basal quand les centres réactionnels du PSII sont ouverts. Par conséquent, le changement de la fluorescence variable $F'_V = F'_M - F'_0$ représente tous les centres réactionnels

du PSII participant aux réactions photochimiques primaires (Rohacek, 2002). Dans ce cas, le rendement photochimique opérationnel du PSII est évalué par :

$$\phi'_M = (F'_M - F'_0) / F'_M \text{ (Genty } et al., 1989)$$

Il a été démontré que le rendement photochimique maximal du PSII, ϕ_M , et le rendement photochimique opérationnel, ϕ'_M , sont des indicateurs sensibles pour détecter les effets toxiques induits par les métaux chez des algues ou des plantes. Par exemple, la valeur de ces deux paramètres est diminuée chez *Halophila ovalis* après exposition de 24 heures à du zinc (76 μ M). Dans ces mêmes conditions, le niveau de fluorescence F_0 en réponse à ce métal a augmenté, mais le niveau F_M est resté stable. Par contre, à des concentrations plus élevées de zinc (153 μ M), F_M a diminué, résultant en une plus grande diminution du rendement photochimique maximal du PSII, ϕ_M (Ralph et Burchett, 1998). Cette augmentation du niveau F_0 peut être attribuée à une inactivation réversible des centres réactionnels du PSII ou bien à une déconnection des antennes LHCII du centre réactionnel du PSII (Hong et Xu, 1999; Lazar, 1999). Il a été démontré que la diminution du rendement photochimique maximal du PSII (ϕ_M) peut être partiellement attribuée à la destruction des pigments de l'antenne chlorophyllienne sous l'effet d'un stress environnemental (De Filippis et Pallaghy, 1994).

Sous illumination continue par la lumière actinique, la diminution de la fluorescence après le niveau F_M «*quenching*» peut être attribuée aux processus photochimiques et non photochimiques. Le *quenching* photochimique, qP, dépend du nombre de centres réactionnels du PSII participant au transport d'électrons de Q_A^- vers Q_B et ensuite vers le pool de PQ, ce qui cause l'atténuation de la fluorescence (Rohacek et Bartak, 1999). En utilisant un flash saturant, le qP permet donc d'estimer la proportion de photons absorbés et utilisés pour la séparation de charges aux centres réactionnels du PSII (Schreiber *et al.*, 1986). Ce paramètre est déterminé par : $qP = (F'_M - F_s) / (F'_M - F'_0)$.

Le rendement photochimique du PSII dépend également des processus non photochimiques, estimés par le *quenching* non photochimique de la fluorescence variable (qN). Ce paramètre permet une caractérisation de la dissipation non radiative de l'énergie d'excitation (Havaux *et al.*, 1991). Le qN est proportionnel au nombre de centre réactionnels

du PSII ne participant pas au transport d'électrons, et qui est évalué par : $qN = 1 - [(F'_M - F'_O) / (F_M - F_O)]$ (Schreiber *et al.*, 1986). Le quenching non photochimique peut également être estimé en considérant uniquement les niveaux de fluorescence maximale à l'état adapté à l'obscurité, F_M , et à celui adapté à la lumière, F'_M , via l'équation : $NPQ = (F_M - F'_M) / F'_M$ (Schreiber *et al.*, 1986).

Les paramètres de fluorescence ϕ'_M , qP et qN , permettent une estimation de la distribution de l'énergie lumineuse absorbée par les antennes collectrices du PSII. Chez les algues *Selenastrum capricornutum*, le mercure (2,5 μM Hg) induit une forte diminution (d'environ 61 %) du rendement photochimique opérationnel ϕ'_M du PSII. Dans ces conditions, le paramètre qN augmente de 500 % (Juneau et Popovic, 2000). La dissipation de l'énergie lumineuse via les voies non photochimiques a donc été fortement stimulée par le Hg chez ces algues. Dans une étude similaire, les cyanobactéries *Spirulina platensis*, exposées à une concentration élevée de 20 μM de Hg, ont montré une diminution de la valeur de qP et de qN (Lu *et al.*, 2000). Cette diminution de qN indique probablement une altération du système régulateur de la dissipation de l'énergie lumineuse sous forme non photochimique lorsque l'activité du PSII est fortement inhibée par le Hg. La diminution observée de qP lorsque *Chlamydomonas reinhardtii* est exposée 24h au méthyl-mercure (5 μM) est induite par l'augmentation de la proportion des centres réactionnels du PSII à l'état non fonctionnel (Kukarskikh *et al.*, 2003). D'autre part, les algues *Scenedesmus obliquus* exposées 12h aux métaux Cd, Cr, Ni, Cu, Ni et Zn ont montré une diminution de la valeur de ϕ_M et qP (Mallick et Mohn, 2003). Cette diminution de ϕ_M a été expliquée par l'inhibition de la réoxydation de Q_A via l'altération du transport d'électrons entre le PSII et PSI; parallèlement, la diminution de qP est causée par l'augmentation du nombre de centres réactionnels du PSII à l'état non fonctionnel.

En utilisant le Maxi-Imaging-PAM, différents paramètres, notés $Y(II)$, $Y(NO)$ et $Y(NPQ)$, ont été mesurés permettant l'estimation des différentes voies de dissipation de l'énergie lumineuse. Pour ces paramètres, le F'_O a été obtenu par l'équation :

$$F'_O = F_O / (F_V / F_M + F_O / F'_M) \text{ (Oxborough and Backer, 1997)}$$

En utilisant la méthode de « *light curve* », les paramètres Y(II), Y(NO) et Y(NPQ) ont été estimés en utilisant les flashes saturants sous différentes intensités de lumière actinique (20 à 1200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ce qui permet une analyse de la distribution d'énergie lumineuse absorbée par les LHCII (White and Critchley, 1999). Dans ce cas, Y(II) représente le rendement photochimique opérationnel du PSII qui est estimé par :

$$Y(\text{II}) = \phi'_M = (F'_M - F'_0) / F'_M \text{ (Genty et al., 1989)}$$

La dissipation d'énergie sous forme non photochimique peut être distinguée en deux composantes principales : Y(NO) et Y(NPQ). La première composante, Y(NO), dépend des processus non régulateurs attribués à des centres réactionnels du PSII fermés ou à des dommages structuraux du PSII induits par un stress environnemental (Kramer et al., 2004). Le rendement quantique de la dissipation d'énergie sous forme non photochimique, par des mécanismes non régulateurs, est calculé avec l'équation :

$$Y(\text{NO}) = 1 / (\text{NPQ} + 1 + qL (F_M/F_0 - 1))$$

Où, qL (estimé par $qP \times F_0'/F$) quantifie les centres réactionnels du PSII ouverts qui participent au transport d'électrons PSII-PSI.

La deuxième composante de la dissipation d'énergie sous forme non photochimique, Y(NPQ), caractérise l'efficacité de cette dissipation par des mécanismes régulateurs impliquant la zéaxanthine pendant le cycle des xanthophylles et autres caroténoïdes. Le rendement quantique de la dissipation d'énergie, par voie non photochimique impliquant ces mécanismes régulateurs, est estimé par l'équation :

$$Y(\text{NPQ}) = 1 - Y(\text{II}) - Y(\text{NO}) \text{ (Kramer et al., 2004)}$$

Il est actuellement bien établi que le *quenching* non photochimique de la fluorescence (NPQ) se divise en trois composantes principales (Figure 1.28 ; Müller et al., 2001) : la composante majeure, Q_E , dépend de la formation du gradient de protons transmembranaire qui provoque des modifications structurales aux protéines thylacoïdiennes. L'augmentation intra-thylacoïdale en protons favorise la formation de la zéaxanthine et son association avec les LHCII, empêchant ainsi le transfert de l'excitation au centre réactionnel du PSII. La

deuxième composante, Q_T , est associée au changement dans les états de transitions (transition état I- état II). La troisième composante, Q_I , est un coefficient évaluant les dommages aux protéines du PSII induits dans des conditions de photoinhibition.

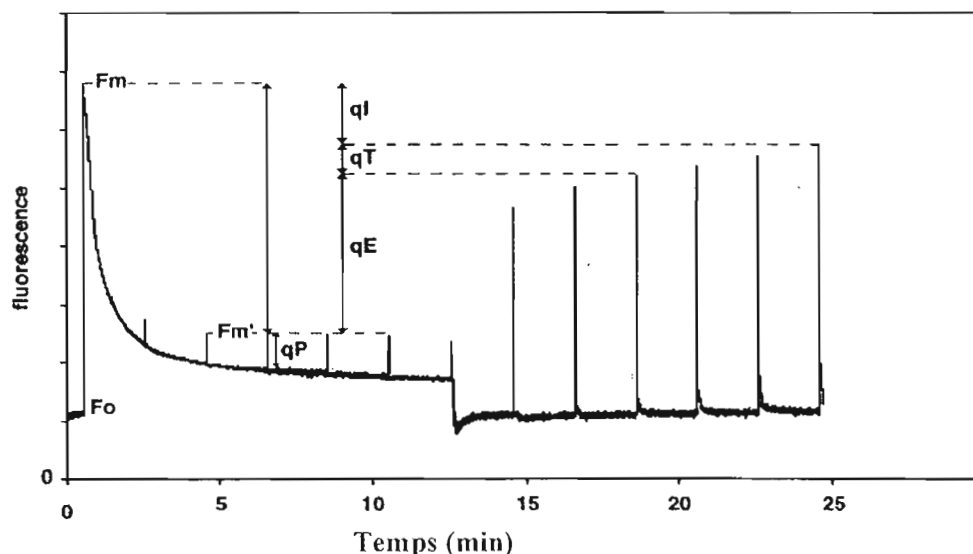


Figure 1.28 : Cinétique de fluorescence modulée mesurée par le fluorimètre PAM sur une feuille d'*Arabidopsis thaliana*. F_0 , fluorescence de base pour une plante adaptée à l'obscurité; F_M , fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité; F_M' , fluorescence maximale pour une plante adaptée à la lumière; Q_E : *Quenching* dépendant du gradient de protons; Q_T : *Quenching* lié aux états de transition; Q_I : quenching lié à la photoinhibition; Q_P : *Quenching* photochimique (d'après Müller *et al.*, 2001).

1.3. EFFET DE XÉNOBIOTIQUES SUR LA TRANSFORMATION DE L'ÉNERGIE LUMINEUSE EN ÉNERGIE CHIMIQUE EN PHOTOSYNTÈSE

La photosynthèse représente un processus physiologique important car elle fournit l'énergie nécessaire pour le métabolisme cellulaire (synthèse des carbohydrates, des acides aminés, des acides gras, etc.), assurant donc la croissance de la biomasse végétale. Une forte interdépendance existe entre les réactions photochimiques de la photosynthèse et les autres processus du métabolisme cellulaire se déroulant dans le cytoplasme cellulaire (Figure 1.29 ; Baker et Rosenqvist, 2004). En conséquence, si la photosynthèse et les processus biochimiques qui sont dépendants d'elle sont affectés par les xénobiotiques, le rendement et

la cinétique de la fluorescence peuvent être utilisés comme indicateurs de détérioration de la photosynthèse et de la physiologie des plantes. Pendant la photosynthèse, la réaction photochimique du PSII représente une étape primordiale pour la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, essentielle pour le métabolisme cellulaire (Dekker et Van Grondelle, 2000). Dans le passé, les études de changements de la fluorescence chlorophyllienne ont permis de définir différents paramètres très utiles pour la compréhension des mécanismes de la photosynthèse (Govindjee, 1995 ; Force *et al.*, 2003). De ce fait, nous pouvons constater que les polluants inhibant la photosynthèse vont induire des changements des paramètres de la fluorescence.

Les effets des métaux lourds (comme le Cd, le Hg et le Cu) et de certains herbicides qui réagissent directement sur les réactions photochimiques du PSII, peuvent être estimés par les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne (Dewez *et al.*, 2002 ; Mallick et Mohn, 2003). Cependant, certains herbicides, comme le métolachlore et l'alachlore, vont altérer le processus d'assimilation du carbone, provoquant ainsi une diminution de l'activité photochimique du PSII. Les herbicides peuvent également induire une altération de l'activité photochimique par l'inhibition de la synthèse des acides aminés et des pigments photosynthétiques (Percival et Baker, 1991; Naessens *et al.*, 2000 ; Juneau *et al.*, 2001). D'autre part, certains polluants atmosphériques peuvent affecter la photosynthèse en diminuant l'absorption de la lumière et l'assimilation de CO₂ en bloquant l'ouverture des stomates. Les plantes exposées à ces polluants montrent une diminution de l'efficacité photochimique et du transport d'électrons photosynthétique, indiquée par les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne (Naidoo et Chirkoot, 2004). Ce type de réponse photosynthétique indique l'état physiologique de l'organisme végétal entier. Par conséquent, le changement de l'activité photosynthétique évaluée par la fluorescence chlorophyllienne représente l'un des biomarqueurs physiologiques les plus fiables et utiles pour la détection des effets toxiques des polluants (Litchenthaler, 1998).

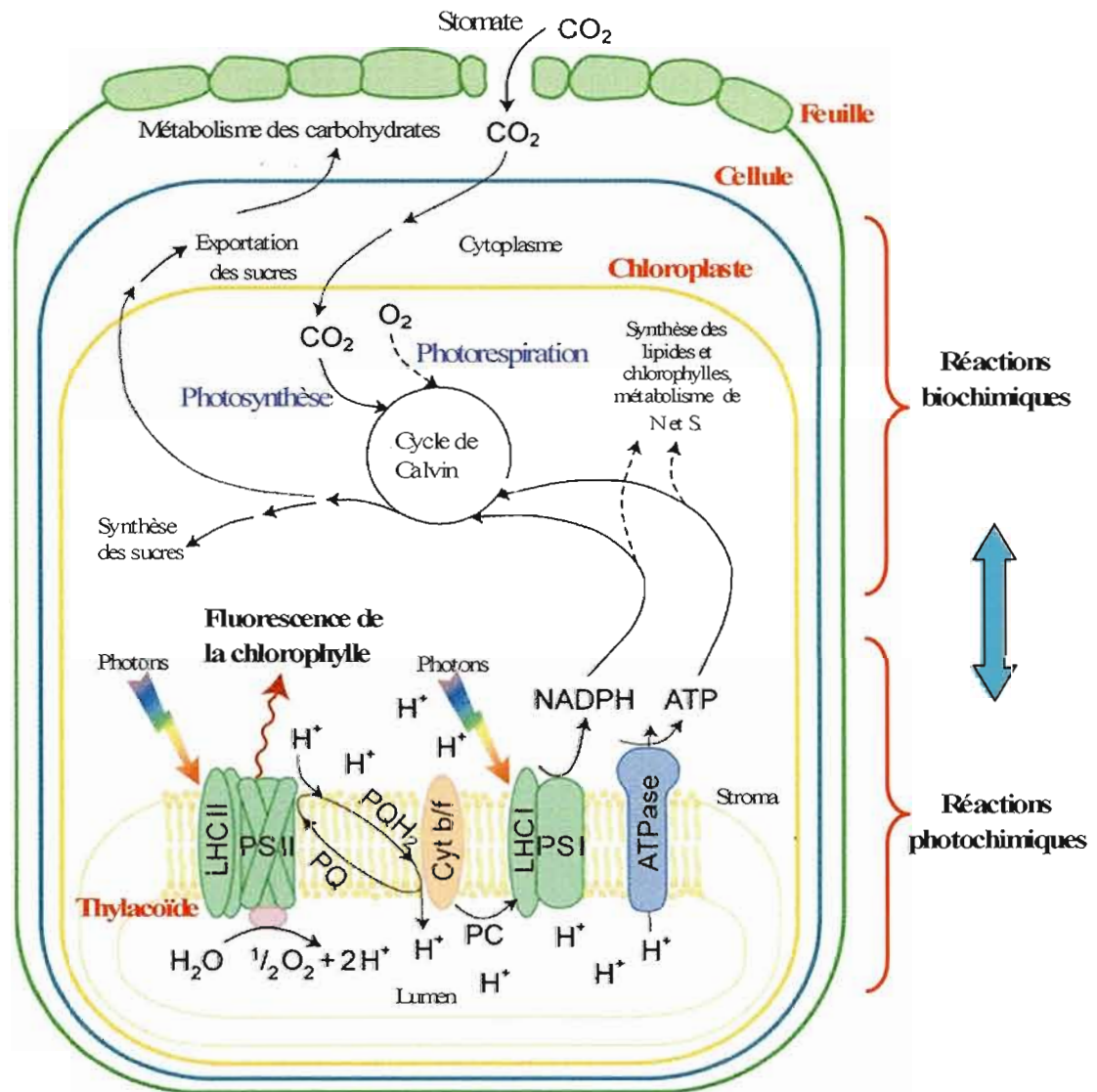


Figure 1.29: Représentation des interconnexions métaboliques entre les réactions photochimiques de la photosynthèse, les réactions biochimiques du chloroplaste et du cytoplasme cellulaire (d'après Baker et Rosenqvist, 2004).

CHAPITRE II

LES PROBLÉMATIQUES ET LES OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DU PROJET DE RECHERCHE :

ÉTUDE DES MÉCANISMES D'INHIBITION DU TRANSPORT DES ÉLECTRONS PHOTOSYNTHÉTIQUES INDUITE PAR LES XÉNOBIOTIQUES AFFECTANT LES RÉACTIONS PHOTOCIMIQUES DU PHOTOSYSTÈME II

Notre projet de recherche consiste à étudier les mécanismes d'inhibition des réactions photochimiques du PSII par deux polluants montrant une grande toxicité. Le premier polluant étudié, le chrome hexavalent (ou dichromate) est utilisé dans plusieurs activités industrielles comme la fabrication des pigments, le traitement des surfaces métalliques, le tannage du cuir et la préservation du bois (Heung *et al.*, 2007 ; Johnson *et al.*, 2006). En raison de ses utilisations industrielles, ce métal peut s'accumuler dans l'écosystème aquatique et induire une toxicité chez de nombreux organismes aquatiques, y compris les plantes et les algues (Pawlisz *et al.*, 1997). Le second polluant étudié est le trinitrotoluène (TNT), un composé nitro-aromatique libéré dans l'écosystème suite à son utilisation intensive dans les activités militaires et sa libération subséquente dans l'environnement. En effet, les sols des sites d'entraînement militaires sont souvent pollués par le TNT (Talmage *et al.*, 1999). À titre d'exemple, ceux de Wainwright en Alberta, et de Minden en Louisiane, peuvent contenir des concentrations élevées de TNT, d'environ 800 et 10000 mg kg⁻¹, respectivement (Robidoux *et al.*, 2000 ; Clark et Boopathy, 2007). Ce composé organique peut persister longtemps dans le sol et induire une toxicité chez les plantes (Krishnan *et al.*, 2000).

Il est bien établi que le dichromate et le TNT peuvent causer une inhibition de la croissance chez les organismes photosynthétiques (Peterson *et al.*, 1998 ; Shanker *et al.*, 2005). Cette inhibition représente la conséquence de perturbations métaboliques se produisant au niveau cellulaire. Par conséquent, nous pouvons supposer que ces polluants inhibent les réactions photochimiques du PSII et le transport des électrons photosynthétiques. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette inhibition ne sont pas encore bien connus. L'objectif global de cette thèse était donc d'utiliser la fluorescence de la

chlorophylle *a* pour étudier les mécanismes d'inhibition du transport des électrons photosynthétiques par le dichromate ou le TNT. Dans cet objectif de recherche, trois problématiques sont présentées dans les paragraphes suivants.

Les altérations structurelles et fonctionnelles de PSII induites par le dichromate vont affecter le rendement et la cinétique de fluorescence. Cette approche permettra l'interprétation des mécanismes d'inhibition au niveau des réactions photochimiques et du transport des électrons photosynthétiques. La réalisation de cette étude permettra la compréhension de la dépendance entre le changement de la cinétique de fluorescence et l'aspect fonctionnel et structurel du PSII affecté par le dichromate. Cette problématique va être étudiée par le changement des transitions rapides (O-J-I-P) de fluorescence durant « l'effet Kautsky ». Les études de cette problématique ont été fondées sur la recherche précédente indiquant que le dichromate inhibe le transport d'électrons au niveau de plusieurs endroits du complexe PSII. Le transport photosynthétique d'électrons dans des membranes thylacoïdales inhibées par le dichromate, n'a pas été rétabli après addition des donneurs exogènes d'électrons au PSII. Cette évidence suggère que le dichromate induit une inhibition du transport d'électrons au centre réactionnel du PSII (Prasad *et al.*, 1991). Chez *Spirodela polyrhiza*, l'inhibition de l'activité du PSII par le dichromate a été associée à une altération de transport d'électrons entre Q_A et Q_B (Apenroth *et al.*, 2001). D'autre part, l'augmentation du rendement de fluorescence à la transition de K démontre que les effets toxiques de ce métal sont associés à l'inhibition du complexe de photolyse de l'eau (Susplugas *et al.*, 2000). L'inhibition du transport photosynthétique d'électrons par le dichromate semble être aussi reliée à une diminution du transfert d'énergie du LHCII vers le centre réactionnel du PSII (Mallick et Mohn, 2003). Cette altération de la photochimie du PSII a été également observée pour d'autres métaux lourds. Par exemple, la détérioration de la photosynthèse chez *Zea mays*, induite par le cuivre, résulte du changement des protéines composant le complexe de photolyse de l'eau (Baron *et al.*, 1995). L'inhibition de l'activité du PSII par le cadmium, chez *Pisum sativum*, a été associée à une altération de la protéine D1 située dans le centre réactionnel du PSII (Franco *et al.*, 1999).

Ces études nous permettent de supposer que l'inhibition du fonctionnement du PSII par le dichromate est associée au changement des composantes protéiques du PSII. Comme la dépendance entre l'inhibition du transport photosynthétique d'électrons par le dichromate et le changement des protéines de PSII n'a toujours pas été considérée dans les autres études, nous l'avons étudiée dans le cadre du projet présenté au chapitre III. Pour cela, nous avons analysé le changement des transitions rapides de fluorescence lorsque la plante aquatique *Lemna gibba* est exposée à ce métal. L'inhibition de l'activité du PSII a été évaluée par les paramètres de la cinétique rapide de fluorescence, qui quantifient les processus d'absorption de l'énergie lumineuse, du transport d'électrons et de la dissipation de l'énergie par voie non photochimique. De façon complémentaire à cette approche, nous avons investigué les altérations structurelles du PSII résultant du changement des composantes protéiques du PSII. Ces protéines, analysées par « *Western blotting* », sont : les protéines associées au LHCII, la protéine D1 du centre réactionnel PSII, et les protéines de 33 et 24 kDa du complexe de photolyse de l'eau. Les résultats obtenus pourront permettre de comprendre les mécanismes d'inhibition du transport d'électrons photosynthétiques par le dichromate. Nous avons aussi étudié le changement de croissance de la biomasse ainsi que la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) lorsque les plantes sont exposées au dichromate. Les degrés de corrélation, d'une part entre la formation des ERO et les paramètres photosynthétiques; et d'autre part, entre les paramètres photosynthétiques et les altérations structurelles du PSII, ont aussi été analysés. Grâce à cette étude, nous avons établi pour le dichromate une corrélation entre l'altération de la protéine D1 et la formation des ERO chez *Lemna gibba*. Dans ces conditions, le transport d'électrons du PSII a été diminué et une grande partie de l'énergie absorbée par les LHCII a été dissipée par voie non photochimique. Ces études nous laissent supposer que le dichromate pourrait favoriser le processus de photoinhibition du PSII.

Par ailleurs, il est établi que, dans des conditions physiologiques normales, la photoinhibition est contrôlée par la dissipation de l'excès d'énergie sous forme non photochimique. Ce processus représente l'un des mécanismes les plus importants de la régulation de l'appareil photosynthétique. La dissipation non photochimique de l'énergie est régulée par le cycle des xanthophylles, qui permet la synthèse de la zéaxanthine lorsque les

plantes sont exposées à une forte intensité lumineuse. Ce rôle régulateur du cycle des xanthophylles est dépendant du gradient de protons transthylacoïdal, qui est lui-même étroitement lié à l'état d'oxydoréduction du transport d'électrons de PSII-PSI. D'autre part, des plantes *Arabidopsis thaliana* ou des algues *Chlamydomonas reinhardtii* ayant un cycle de xanthophylles non fonctionnel montrent une faible capacité de dissipation d'énergie lumineuse par voie non photochimique. Cette altération est accompagnée d'une sensibilité du PSII à la photoinhibition chez les mutants déficients en zéaxanthine (Niyogi *et al.*, 1998 ; Govindjee et Seufferheld, 2002). Ce processus de dissipation non photochimique de l'excès d'énergie peut être modifié par l'exposition des plantes aux xénobiotiques (Cu, Cd et Cr par exemple), qui interfèrent avec le processus de photoinhibition (Pätsikkä *et al.*, 1998; Pagliano *et al.*, 2006; Ait Ali *et al.*, 2006). Les études portant sur les mécanismes de régulation de la dissipation non photochimique de l'énergie demandent une recherche fondamentale approfondie. Ainsi, l'utilisation des plantes ou des algues mutantes offre-t-elle une approche très convenable pour effectuer ce type d'études. Pour le projet présenté au chapitre IV, l'objectif était d'étudier les effets toxiques du dichromate sur l'activité du PSII chez des algues ayant une faible capacité de dissipation non photochimique de l'énergie. Pour cela, nous avons utilisé deux algues mutantes de *C. reinhardtii*, caractérisées par une altération de la biosynthèse de pigments xanthophylles (voir Figure 1.30 ; Niyogi *et al.*, 1997). Le premier mutant, désigné par *npq1*, est déficient en violaxanthine dé-époxydase (EC 1.10.99.3), ce qui cause une déficience en zéaxanthine et anthéroxanthine. Le deuxième mutant, *npq2*, est déficient en zéaxanthine époxydase (EC 1.14.13. 90), ce qui induit une déficience en violaxanthine et anthéroxanthine. Nous avons bénéficié de ces mutants pour étudier l'effet du dichromate dans des conditions favorisant la photoinhibition. Après exposition au dichromate, ces algues ont été illuminées par différentes intensités lumineuses pour analyser le changement du rendement photochimique opérationnel du PSII et la dissipation de l'énergie sous forme non photochimique. Par cette approche, il a été possible d'évaluer, d'une part, la sensibilité au dichromate des algues ayant une altération du processus de dissipation d'énergie, et d'autre part, l'interaction de la toxicité du dichromate avec le processus de photoinhibition. Ces résultats ont permis l'élaboration d'un modèle des effets du dichromate sur l'activité du PSII chez les algues ayant un cycle de xanthophylles non fonctionnel.

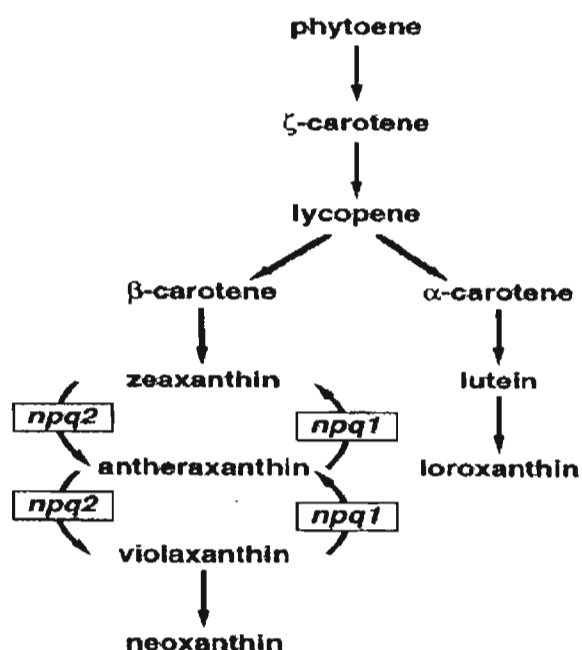


Figure 2.1. Voie de biosynthèse des xanthophylles chez *Chlamydomonas reinhardtii* (d'après Niyogi *et al.*, 1997).

Pour le projet présenté au chapitre V, la problématique était d'analyser le changement du rendement et la cinétique de fluorescence chlorophyllienne lorsque la croissance de la plante *Lactuca sativa* est affectée par le trinitrotoluène (TNT). Dans cette problématique, l'objectif était d'utiliser les paramètres photosynthétiques, fondés sur la fluorescence chlorophyllienne, comme indicateurs de la toxicité du TNT chez *L. sativa*. Le changement des transitions rapides et la cinétique lente de fluorescence ont été mesurés pour distinguer les effets toxiques de ce polluant sur la photosynthèse. Les paramètres photosynthétiques, utilisés comme indicateurs de la toxicité du TNT, concernent la dissipation d'énergie lumineuse en excès par voie non photochimique, ainsi que le rendement de la fluorescence variable lorsque les plantes sont adaptées à l'obscurité ($F_M - F_0$) et à la lumière ($F'_M - F_S$). Les résultats obtenus ont permis d'estimer la fiabilité de ces paramètres photosynthétiques comme biomarqueurs de l'état physiologique de la plante *L. sativa*. Cette étude a également permis de déterminer les critères méthodologiques nécessaires pour un bioessai.

CHAPITRE III

INHIBITION OF PHOTOSYSTEM II PHOTOCHEMISTRY BY CHROMIUM IS CAUSED BY THE ALTERATION OF BOTH D1 PROTEIN AND OXYGEN EVOLVING COMPLEX

Nadia Ait Ali, David Dewez, Olivier Didur and Radovan Popovic *

University of Quebec in Montreal, Department of Chemistry, Environmental Toxicology
Research Center, TOXEN, 2101, Jeanne-Mance, Montreal (Quebec) Canada, H2X 2J6

*Corresponding author

Published at Photosynthesis Research, 89: 81-87, 2006

3.1 RÉSUMÉ

L'effet du chrome (Cr) sur le transport d'électrons du photosystème II (PSII) et le changement de la teneur en protéines dans le complexe de PSII ont été étudiés. Lorsque *Lemna gibba* est exposée au Cr pendant 96 h, l'inhibition de la croissance semble être associée à un changement du transport d'électrons de PSII au niveau des deux côtés, oxydant et réducteur, du PSII. L'analyse du changement du rendement des transitions K, J, I et P suggère que l'effet inhibiteur du Cr sur l'activité du PSII est associé à une inhibition du système de la photolyse de l'eau, ainsi que celle de la réduction de Q_A . Ces effets inhibiteurs induits par le Cr ont été aussi reliés à l'altération de la protéine D1 du centre réactionnel PSII et de la protéine de 33 kDa du complexe de photolyse de l'eau. L'inhibition du transport d'électrons du PSII et la formation des espèces réactives de l'oxygène induites par le Cr ont été fortement corrélées avec la diminution de la teneur de la protéine D1 et de la protéine de 33 kDa. Par conséquent, l'altération fonctionnelle de l'activité du PSII par le Cr est étroitement associée au changement structurel dans le complexe du PSII.

3.2 ABSTRACT

The effect of chromium (Cr) on photosystem II (PSII) electron transport and the change of proteins content within PSII complex were investigated. When *Lemna gibba* was exposed to Cr during 96 h, growth inhibition was found to be associated with an alteration of the PSII electron transport at both PSII oxidising and reducing sides. Investigation of fluorescence yields at transients K, J, I and P suggested for Cr inhibitory effect to be located at the oxygen evolving-complex and Q_A reduction. Those Cr-inhibitory effects were related to the change of the turnover of PSII D1 protein and the alteration of 33 kDa protein of the oxygen-evolving complex. The inhibition of the PSII electron transport and the formation of reactive oxygen species induced by Cr were highly correlated with the decrease in the content of D1 protein and the amount of 33 kDa protein. Therefore, functional alteration of PSII activity by Cr was closely related with the structural change within PSII complex.

Keywords : Photosystem II electron transport; D1 protein; oxygen-evolving complex; chromium; PEA fluorometry.

3.3 INTRODUCTION

Industrial activities are responsible for Cr release into the environment causing toxic effect on different plant species. Under some condition, toxic effect of hexavalent Cr on plant was pronounced at very low concentration (Efroymson et al. 1997; Pawlisz et al. 1997). In *Pisum sativum* seedlings, Cr has been shown to cause a strong inhibition of photosynthesis, respiration and nitrogen fixation process (Bishnoi et al. 1993). When photosynthetic electron transport in thylakoid membranes was inhibited by Cr, the addition of exogenous electron donors to photosystem II (PSII) did not recover DCPIP (2,6-dichlorophenol indophenol) photoreduction. This evidence suggested for Cr induced inhibition to be located on the PSII reducing side (Prasad et al. 1991). Additional evidence was found when *Spirodela polyrhiza* was exposed to Cr toxic effect, F_0 fluorescence yield after a second saturating flash was increased indicating the formation of closed PSII reaction centers which did not proceed electron transport toward to Q_B reduction. Such alteration of PSII photochemistry suggested for Cr inhibition site to be situated between Q_A and Q_B electron carriers (Appenroth et al. 2001). On the other hand, the increase of fluorescence yield at K transient suggested for Cr toxic effect to be associated with the inhibition of the PSII oxygen evolving complex (Susplugas et al. 2000). For Cr inhibition of photosynthetic electron transport was found to decrease the efficiency of energy transfer from light harvesting complex to PSII reaction center (Mallick and Mohn 2003).

Inhibition of PSII photochemistry was also noticed for other heavy metals. Inhibition of *Zea mays* photosynthesis induced by copper was found to be caused by the alteration of proteins having a role in the oxygen-evolving complex (Baron et al. 1995). Cadmium inhibition of PSII activity in *Pisum sativum* leaves was shown to be caused by the alteration of D1 protein indicating for the inhibitory site to be on the reducing side of PSII (Franco et al. 1999).

We may suppose for Cr inhibition of PSII photochemistry to be associated with the alteration of PSII electron transport components. However, the relationship between the inhibition of PSII electron transport by Cr and the alteration of PSII proteins has not still been

considered to our knowledge. In this study, when *Lemna gibba* was exposed to Cr toxic effect, we investigated the dependency between the inhibition of PSII photochemistry and the alteration of PSII proteins as D1, the water-splitting system and proteins of the antenna complex.

3.4 MATERIALS AND METHODS

3.4.1 Plant growth conditions

Lemna gibba was obtained from algae and cyanobacteria collection culture (UTCC, University of Toronto, Canada). *L. gibba* plants were grown under controlled conditions (at 24 °C and 100 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ of illumination) in a nutrient solution as described by Frankart et al. (2002). For experiments five plants of *L. gibba* at the stage of three fronds were placed in a Petri dish containing 60 ml of growth medium having Cr (potassium dichromate : $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) concentrations : 20, 100 and 200 μM . To prevent nutrient deficiency, plants were transferred every 24 h to fresh medium during 96 h. After 96 h fresh weight of *L. gibba* was measured.

3.4.2 Measurement of reactive oxygen species

The formation of reactive oxygen species (ROS) in *L. gibba* plants was measured according to Babu et al. (2003).

3.4.3 Isolation of thylakoid membranes

Thylakoid membranes were isolated according to La Porta et al. (2005). One gram of *L. gibba* fresh weight was homogenized in ice-cold Buffer A containing 330 mM sucrose, 5 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl and 50 mM Tris (pH 7.8), and pellet of chloroplasts were collected after centrifugation during 5 min at 6000 g. Chloroplast were exposed to osmotic shock in Buffer B (Buffer A lacking sucrose), and thylakoid membranes after centrifugation at 6000 g during 10 min were collected and resuspended in 100 mM sucrose, 5 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, and 50 mM Tris (pH 7.8).

3.4.4 Chlorophyll determination

Chlorophyll extraction from *L. gibba* leaves and thylakoid membranes were done in 80 % of acetone. Chlorophyll concentration was determined according to Lichtenthaler (1987).

3.4.5 SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis and Western Blotting

Proteins of thylakoid membranes were separated by SDS-PAGE according to Laemmli (1970) by using equal chlorophyll concentration (1.5 µg) on each lane of the polyacrylamide gel. For immunoblotting, proteins separated by SDS-PAGE were transferred at 4°C to polyvinylidene difluoride membrane by using the Tris/glycine/methanol buffer as described previously (De Boer and Ward 1990). The primary antibodies used for Western blot analysis were against D1, LHCII, OEC 33 and 24 kDa proteins. As secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Amersham Biosciences) was used to detect the immuno-reactions. The immuno-complexes were detected by using an enhanced chemiluminescence kit (ECL, Amersham Biosciences), and were visualized by autoradiography using Fuji RX as detection film. Densitometric analysis of the protein bands in the autoradiographic film was performed by using molecular Analyst Software of IPLab Gel.

3.4.6 Chlorophyll *a* fluorescence measurements

Prior to chlorophyll *a* fluorescence measurements, leaves of *L. gibba* were dark-adapted for 30 min to obtain an oxido-reduction equilibrium of PSII-PSI electron transport carriers.

The Plant Efficiency Analyzer fluorometer (PEA, Hansatech® Ltd., UK) was used to measure the rapid polyphasic chlorophyll *a* fluorescence kinetic during 6 sec induced by a light intensity of 3000 µmol photons m⁻² s⁻¹. Fluorescence yield (F) at investigated fluorescence transients was determined according to Strasser and Strasser (1995). The fluorescence yield at 50 µs was considered as F₀ value (F_{50µs}) when all reaction centers of

PSII are open. The maximal fluorescence yield, F_M was determined at P transient and the variable fluorescence yields related to K, J and I transients were determined at 300 μ s, 2 and 30 ms, respectively.

Different photosynthetic parameters associated to PSII activity were evaluated (Strasser and Strasser, 1995; Force et al. 2003): (1) the absorption of photons (ABS) per active reaction center (RC) showing the antenna size was estimated by the ratio $ABS/RC = (M_o/V_J)/\phi_{P_o}$, (2) the electron transport per active reaction center was $ET_o/RC = (M_o/V_J) \times (1 - V_J)$, (3) the non-photochemical energy dissipation per active reaction center as $DI_o/RC = ABS/RC - (M_o/V_J)$ and (4) the amount of functional PSII reaction centers per leaf cross section was $RC/CS = F_M \times \phi_{P_o} \times V_J/M_o$. For those parameters, M_o value, as an indication of the water splitting system function, was estimated as $M_o = (F_{300\mu s} - F_{50\mu s}) / ((F_M - F_{50\mu s}) \times 0.25)$. The fluorescence quantum yield at J transient as $V_J = (F_{2ms} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})$ was used as indication for PSII efficiency in primary photochemistry. The quantum yield at P transient, as indication of the PSII efficiency in the plastoquinone pool reduction, was evaluated by $\phi_{P_o} = (F_M - F_{50\mu s})/F_M$ (for review see Strasser et al. 2004).

3.4.7 Data analysis and statistics

The experiments were done at least in three replicates for all treatments. Means and standard deviation were estimated for each treatment. Significant differences between controls and Cr treated samples were determined by using Student's *t* test where *p* value less than 0.05 was considered to be significant.

3.5 RESULTS AND DISCUSSION

When *L. gibba* was exposed to Cr (from 20 to 200 μ M Cr), the inhibition of growth was gradually increased reaching 90 % compared to control for the highest chromium concentration. However, chlorophyll synthesis per fresh weight was decreased at a less extent since the inhibition was only 40 % at 200 μ M Cr (Figure 3.1). The inhibition of growth and chlorophyll synthesis by Cr was earlier reported in studies with *Vallisneria spiralis* and *Spirodela polyrhiza* (Vajpayee et al. 2000; Appenroth et al. 2001).

Photosystem II (PSII) electron transport appeared also to be affected by Cr, since the variable fluorescence yield was significantly decreased. If fluorescence yield was normalised by F_0 values, fluorescence levels at J, I and P transients were also gradually decreased when Cr concentration was increased (Figure 3.2, a). This decrease in fluorescence yield at J and I transients may indicate a diminished PSII electron transport contributing to Q_A and Q_B reduction, according to Lazár (2006). The fluorescence quenching effect induced by Cr at transient P indicated the inhibition of linear electron transport from PSII towards to Photosystem I (Figure 3.2, a). The transient at 300 μ s, so called K transient (Strasser 1997) was found when *L. gibba* was exposed to 100 and 200 μ M of Cr (Figure 3.2, b). For found 300 μ s transient we may interpret for Cr to inhibit the oxygen-evolving complex, since the appearance of fluorescence transient at 300 μ s was reported to be evident for inhibition of the oxygen-evolving complex in *Scenedesmus obliquus* cells, *Pisum sativum* and *Spirodela polyrrhiza* leaves (Strasser 1997; Srivastava et al. 1997; Liu et al. 2006). The inhibition of the oxygen evolving complex by Cr may result in a decrease of the number of active PSII reaction centers contributing to total PSII electron transport. Therefore, the decrease of the number of active PSII reaction centers resulted in an increase of the average antenna size per active reaction center (ABS/RC) which was shown in this study (Figure 3.3). Here, we showed for Cr to induce an alteration of architecture within PSII complex which was indicated by the increase of ratio LHCII/D1. We noticed an increase of this ratio by 49 and 75 % for Cr treatments at 100 and 200 μ M concentrations, respectively (Figure 3.4). This protein analysis is in accordance with data of fluorescence measurement showing for Cr to increase the antenna size per active reaction center (see again Figure 3.3). From such alteration of PSII, we may expect the change of energy dissipation via non-photochemical pathways. Consequently, when *L. gibba* is exposed to Cr toxic effect non-photochemical energy dissipation per reaction center, DI_0/RC should increase since relative increase of light harvesting complex per reaction center will be in favour to increase the energy dissipation via non-photochemical pathways. Indeed, when *L. gibba* was exposed to Cr toxic effect, we found an evident increase of non-photochemical energy dissipation per active PSII reaction center (DI_0/RC). This dissipation may attain 300 % for 200 μ M Cr treatment when compared to control (Figure 3.3).

For the inhibition of PSII activity, when *L. gibba* was exposed 96h to Cr effect, we suppose to be, also caused by the change of proteins within PSII complexes. When we investigated the change in the amount of D1, light harvesting complex (LHCII) and the oxygen-evolving complex proteins (OEC 24 and OEC 33 kDa), for D1 protein was found to decrease by 48 % at 200 μ M Cr, and for 33 and 24 kDa, proteins, to decrease by 29 and 17 %, respectively. However, under the same condition, no significant change was found for the light harvesting complex (Figure 3.4, a and b). The alteration of the D1 and oxygen-evolving complex proteins appeared to be similar to those found when *Pisum sativum* and *Zea mays* were exposed to cadmium and copper, respectively (Baron et al. 1995; Franco et al. 1999). With no doubt, we showed for Cr to affect the turnover of PSII D1 protein and to diminish the content of 24 and 33 kDa proteins of the OEC, which may contribute to decrease the PSII electron transport as we also indicated here. Depletion of the 33 kDa without affecting the 24 kDa proteins of the OEC was earlier reported for Hg^{2+} effect on barley and spinach thylakoid (Bernier and Carpentier 1995). However, it appeared that heavy metals may demonstrate some differences concerning this effect. For example, Zn^{2+} and Pb^{2+} have been shown to induce visible depletion of 24 kDa and to a much less extent the 33 kDa protein (Rachid et al. 1994).

On the other hand, for the inhibition of PSII electron transport by exogenous factors, it has been reported to cause a formation of oxygen radicals and consequently oxidative stress (Babu et al. 2001; Rutherford and Krieger-Liszky 2001). It is important to mention when *Sorghum bicolor* and *Ocimum tenuiflorum* were exposed to Cr lipid peroxidation and chlorophyll synthesis alteration were found as indication for the presence of an oxidative stress (Rai et al. 2004; Shanker and Pathmanabhan 2004). These indications may impose the question on the relationship between the formation of reactive oxygen species (ROS) and PSII functional-structural state when *L. gibba* was exposed to Cr effect. Here, we found a high linear correlation ($R^2 = 0.986$) between the ROS formation and the content of D1 protein in isolated thylakoid membranes when *L. gibba* was treated with Cr (Figure 3.5, a). A high correlation ($R^2 = 0.956-0.982$) was found between Cr induced change of D1 protein and PSII functional state and also between ROS formation and PSII functional state (Figure 3.5, b, c). In *Synechocystis* sp. cell, for ROS it has been shown to induce inhibition of the repairing

mechanism of PSII by suppressing the synthesis of D1 protein (Nishiyama et al. 2004). However, there is also evidence that ROS may induce direct degradation of D1 peptide bonds (Lupínková and Komenda 2004). These mechanisms of ROS toxicity should be concerned when D1 protein is affected by Cr. Therefore by those reasons, photoinhibition of PSII can not be excluded as an indirect effect linked to Cr toxicity.

In conclusion for Cr induced toxic effect on *L. gibba*, causing inhibition of PSII electron transport, it has been found to be closely related with formation of oxygen radicals and the alteration of D1 and OEC proteins. Therefore, the functional alteration of PSII activity by Cr effect should be closely related with structural change within PSII complex.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Natural Science and Engineering Council of Canada (NSERC) through Grant GP0093404 awarded to R. Popovic. Special acknowledgment goes to Dr. Matilde Baron from the Department of Biochemistry (EEZ, CSIC, Granada, Spain) for kindly supplying the primary antibodies used in the present study for immuno-detection of PSII D1, LHCII and OEC polypeptides.

3.7 REFERENCES

- Appenroth, K.J., J. Stöckel, A.Srivastava and R. J. Strasser. 2001. "Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurements". *Environ. Pollut.*, vol.115, p. 49-64.
- Babu, T. S., J. B. Marder, S.Tripuranthakam, D. G. Dixon and B. M. Greenberg. 2001. "Synergistic effects of photooxidized polycyclic aromatic hydrocarbon and copper on photosynthesis and plant growth : evidence that in vivo formation of ROS is a mechanism of copper toxicity". *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 20, p. 1351-1358.
- Babu, T.S., T. A. Akhtar, M. A. Lampi, S.Tripuranthakam, D.G. Dixon and B. M. Greenberg, 2003. "Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: implication of reactive oxygen species as common signals". *Plant Cell Physiol.*, vol. 44, p. 1320-1329.

- Baron, M., J. Rahoutei, J. J. Lazaro and I. Garcia-Luque. 1995. "PSII response to biotic and abiotic stress". In *Photosynthesis : From Light to Biosphere*. Editor, P. Mathis. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, vol IV, pp. 897-900.
- Bernier, M. and R. Carpentier. 1995. "The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II". *FEBS Lett.*, vol. 360, p. 251-254.
- Bishnoi, N. R., L. K. Chugh and S. K. Sawhney. 1993. "Effect of Cr on photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings". *J. Plant Physiol.*, vol. 142, p. 25-30.
- De Boer, S. H. and L. Ward. 1990. "Western blotting for detection of bacterial antigens". In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. Editors, R. Hampton, E. Ball and S. De Boer. St Paul, Minnesota: APS Press, pp. 281-285.
- Efroymson, R. A., M. E. Will, G. W. Suter and A. C. Wooten. 1997. "Toxicological Benchmarks for Screening Contaminants of Potential Concern for Effects on Terrestrial Plants". *Revision prepared for the US Department of Energy Office of Environmental Management*.
- Franco, E., S. Alessandrelli, J. Masojidek, A. Margonelli and M. T. Giardi. 1999. "Modulation of D1 protein turnover under cadmium and heat stress monitored by [³⁵S] methionine incorporation". *Plant Sci.*, vol. 144, p. 53-61.
- Frankart, C., P. Eullafroy and G. Vernet. 2002. "Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 53, p. 439-445.
- Force, L., C. Critchley and J. J. S. Van Rensen. 2003. "New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants". *Photosynth. Res.*, vol. 78, p. 17-33.
- Laemmli U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, vol. 227, p. 680-685.
- La Porta, N., M. Bertamini, N. Nedunchezian, P. Raddi and K. Muthuchelian. 2005. "Photoinhibition of photosynthesis in needles of two cypress (*Cupressus sempervirens*) clones". *Tree Physiol.*, vol. 25, p. 1033-1039.
- Lazár, D. 2006. "The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light". *Funct. Plant Biol.*, vol. 33, p. 9-30.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. "Chlorophylls and carotenoids : pigments of photosynthetic biomembranes". In *Methods in enzymology*: Editors, L. Packer and R. Douce. London: Academic Press, vol. 148, p. 350-382.

- Liu, Q., Y. Zhu, H. Tao and N. Wang. 2006. "Damage of PSII during senescence of *Spirodela polyrrhiza* explants under long-day conditions and its prevention by 6-benzyladenine". *J. Plant Res.*, vol. 119, p. 145-152.
- Lupinková, L. and J. Komenda. 2004. "Oxidative modifications of the photosystem II D1 protein by reactive oxygen species : from isolated protein to Cyanobacterial cells". *Photochem. Photobiol.*, vol. 79, p. 152-162.
- Mallick, N. and F. H. Mohn. 2003. "Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research : a case study with the green microalga *Scenedesmus*". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 55, p. 64-69.
- Nishiyama, Y., S. I. Allakhverdiev, H. Yamamoto, H. Hayashi and N. Murata. 2004. "Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803". *Biochemistry*, vol. 43, p. 11321-11330.
- Pawlisz, A.V., R. A. Kent, U.A. Schneider and C. Jefferson. 1997. "Canadian water quality guidelines for Cr". *Environ. Toxicol. Water Qual.*, vol. 12, p. 185-193.
- Prasad, S. M., J. B. Singh, L. C. Rai et H. D. Kumar. 1991. "Metal-induced inhibition of photosynthetic electron transport chain of the cyanobacterium *Nostoc muscorum*". *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 82, p. 95-100.
- Rachid, A., Camm, E. L. and A. K. M. Ekramoddoullah. 1994. "Molecular mechanism of action of Pb^{2+} and Zn^{2+} on water oxidizing complex of photosystem II". *FEBS Lett.* vol. 350, p. 296-298.
- Rai, V., P. Vajpayee, S. N. Singh and S. Mehrotra. 2004. "Effect of Cr accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, praline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L". *Plant Sci.*, vol. 167, p. 1159-1169.
- Rutherford, A. W. and A. Krieger-Liszkay. 2001. "Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II". *Trends Biochem. Sci.*, vol. 26, p. 648-653.
- Shanker, A. K. and G. Pathmanabhan. 2004. "Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench cv CO 27) under Cr(III) and Cr(VI) stress". *Plant Soil*, vol. 265, p. 141-151.
- Srivastava, A., B. Guissé, H. Greppin and R. J. Strasser. 1997. "Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient : OKJIP". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1320, p. 95-106.

- Strasser, B. J. and R. J. Strasser. 1995. "Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions : The JIP-test". In *Photosynthesis : From light to Biosphere*. Editor, P. Mathis. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, vol. V, pp 977-980.
- Strasser, B. J. 1997. "Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients". *Photosynth. Res.*, vol. 52, p.147-155.
- Strasser, R. J., A. Srivastava and M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient". In *Advances in Photosynthesis and respiration. Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis*. Editors, G. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, vol. 19, pp. 321-362..
- Susplugas, S., A Srivastava and R. J. Strasser. 2000. "Changes in the photosynthetic activities during several stages of vegetative growth of *Spirodela polyrhiza* : Effect of chromate". *J Plant Physiol.*, vol. 157, p. 503-512.
- Vajpayee P., U. N. Rai, M. B. Ali, R. D. Tripathi, V. Yadav, S. Sinha and S. N. Singh. 2001. "Cr-induced physiologic changes in *Vallisneria spiralis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluent". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 67, p. 246-256.

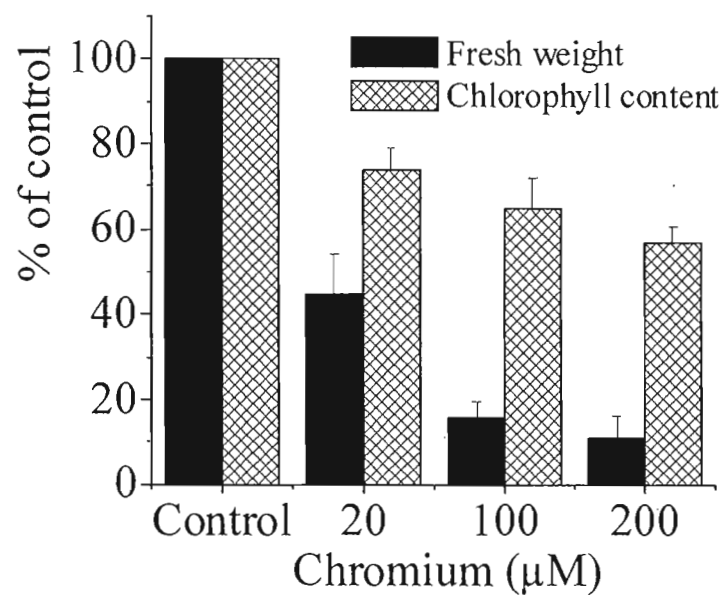


Figure 3.1 : The fresh weight and chlorophyll content of *L. gibba* exposed 96 h to Cr relative to control. Data represent the mean of minimum three experiments.

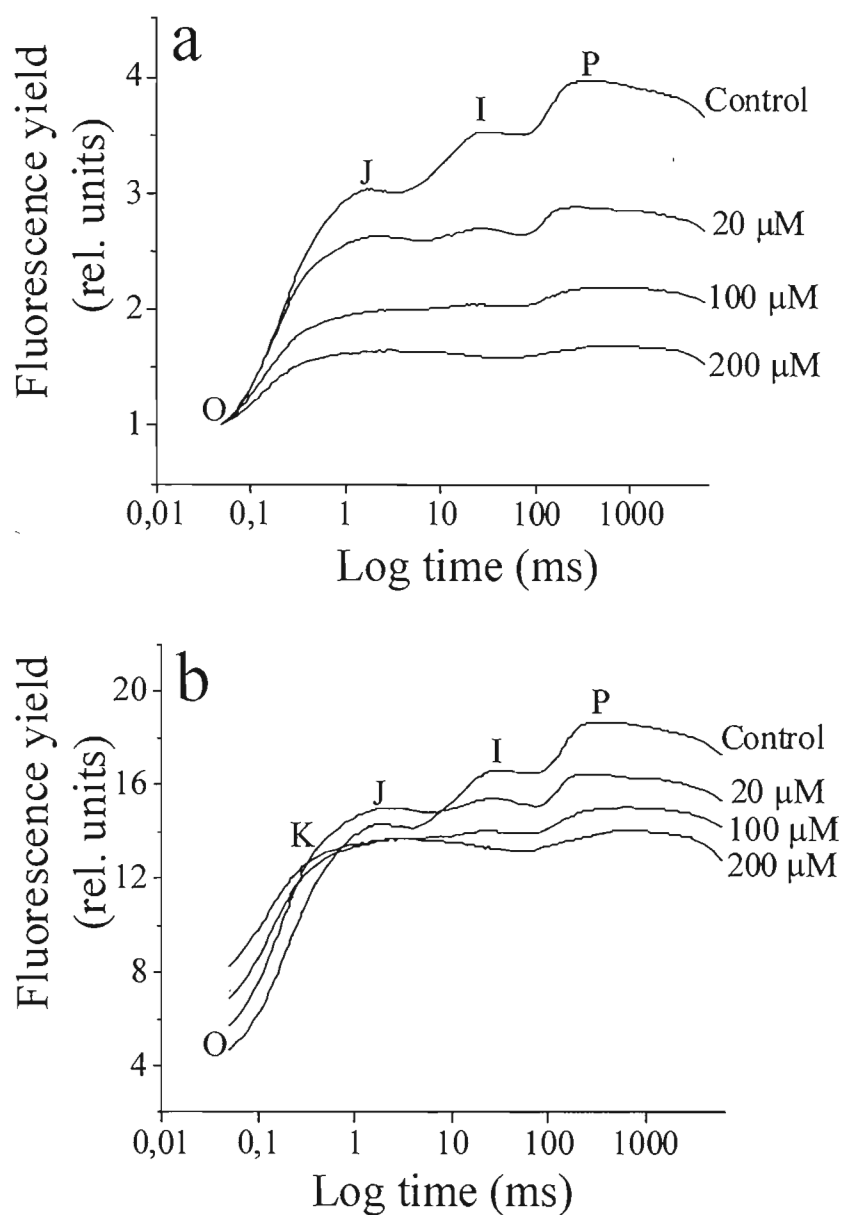


Figure 3.2 : Kinetics of in vivo Chl *a* fluorescence when *L. gibba* was exposed 96 h to Cr. **(a)** Fluorescence yield was normalized by F_0 level. **(b)** Original fluorescence measurement without normalization.

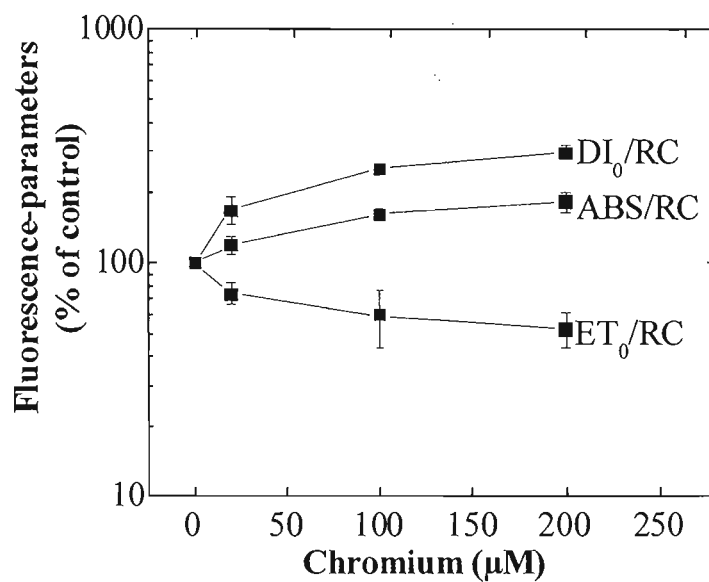


Figure 3.3 : Value for average antenna size (ABS/RC) per PSII reaction center. Specific electron transport (ET₀/RC) and specific non-photochemical energy dissipation (DI₀/RC) when *L. gibba* was exposed 96 h to Cr. For more details, see material and methods.

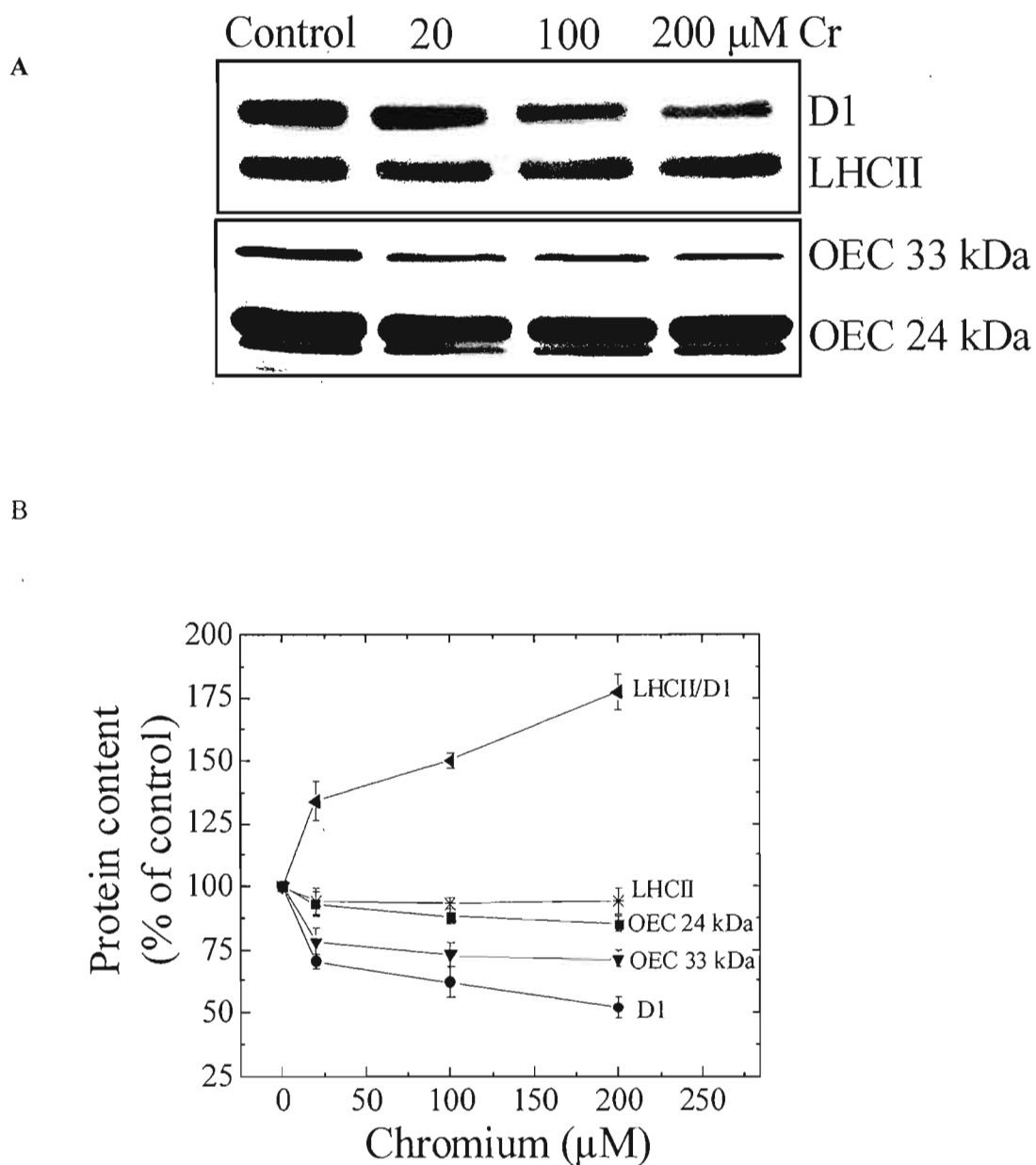


Figure 3.4 : A : Protein gel blots analysis of thylakoid membranes isolated from *L. gibba* exposed 96 h to Cr. Proteins were detected by using specific antibodies raised against D1 protein, LHCII antenna complex, 33 kDa and 24 kDa proteins of the oxygen evolving complex. B : D1, LHCII, 33 kDa and 24 kDa proteins relative to the control set up as 100 %.

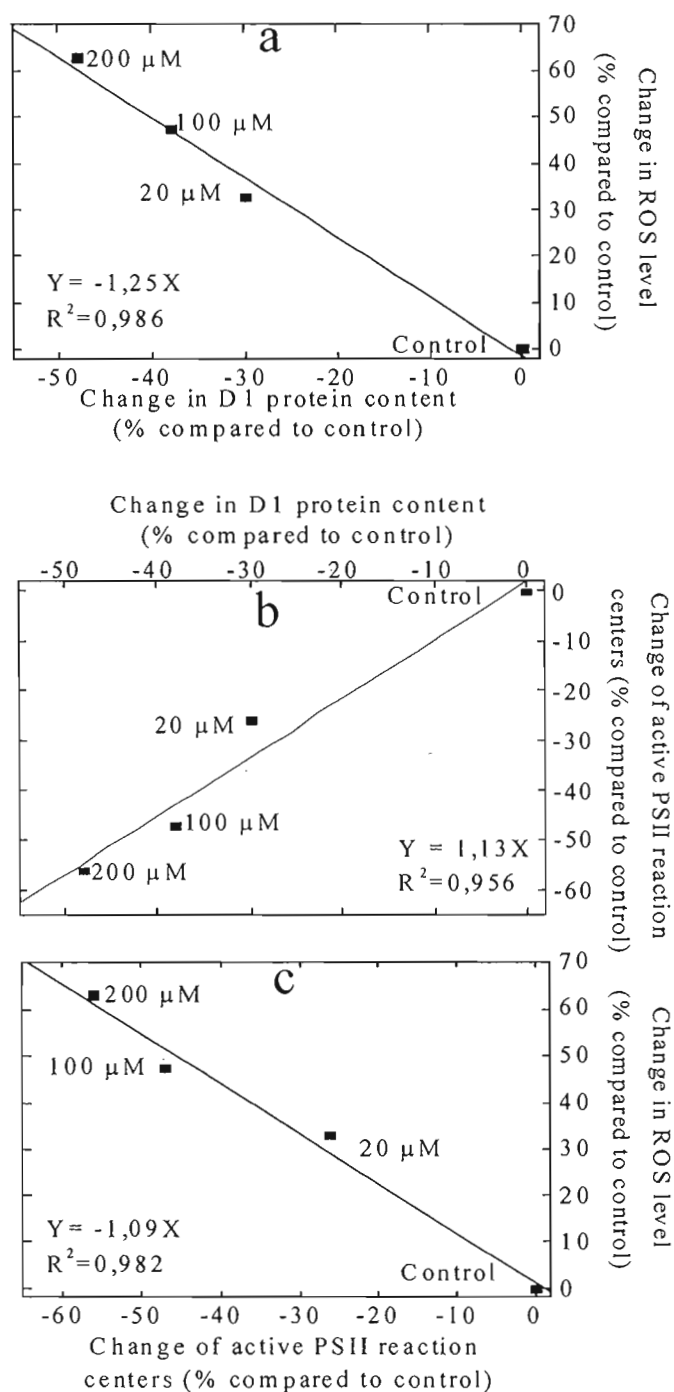


Figure 3.5 : A : Correlation between the change of D1 protein and intracellular level of reactive oxygen species (ROS) when *L. gibba* was exposed 96 h to Cr, B : correlation between the change of D1 protein and amount of active PSII reaction centers per leaf cross-section (RC/CS) when *L. gibba* was exposed 96 h to Cr, and c : correlation between the change of intracellular level of ROS and RC/CS when *L. gibba* was exposed 96 h to Cr.

CHAPITRE IV

EFFECT OF DICHROMATE ON PHOTOSYSTEM II ACTIVITY IN XANTHOPHYLL-DEFICIENT MUTANTS OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Nadia Ait Ali¹, Philippe Juneau², Olivier Didur¹, François Perreault¹ and Radovan Popovic^{1*}

1) University of Quebec in Montreal, Department of Chemistry, Environmental Toxicology Research Center, TOXEN, 2101, Jeanne-Mance, Montreal (Quebec) Canada, H2X 2J6

2) Department of Biological Sciences – TOXEN, Canadian Research Chair on Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal (Quebec), H3C 3P8, Canada

*Corresponding author

Published at Photosynthesis Research, 95: 45-53, 2007.

4.1 RÉSUMÉ

L'activité et la dissipation d'énergie du photosystème II ont été étudiées quand des mutants d'algues de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été exposés aux effets toxiques du dichromate. L'exposition, pendant 24h aux effets toxiques du dichromate, de deux mutants de *C. reinhardtii*, ayant un cycle de xanthophylles non fonctionnel, identifiés par *npq1* (déficient en zéaxanthine) et *npq2* (accumulant la zéaxanthine), a provoqué une inhibition du transport d'électrons du PSII. Après exposition au dichromate, l'activité du PSII de ces mutants a été étudiée dans des conditions d'intensités variables de lumière actinique. Pour déterminer la toxicité du dichromate et l'effet d'intensité de la lumière sur les propriétés fonctionnelles de PSII, nous avons étudié le changement de la dissipation d'énergie via le transport d'électrons de PSII, la dissipation non photochimique d'énergie impliquant des mécanismes régulateurs et non régulateurs. Nous avons établi par la suite un modèle indiquant la dépendance entre l'effet de la toxicité du dichromate et la photoinhibition induite par la lumière chez les algues ayant un cycle de xanthophylles non fonctionnel. Lorsque ces mutants d'algues ont été exposés aux effets toxiques du dichromate et à une intensité lumineuse élevée, la dissipation d'énergie, sous forme non photochimique et impliquant des processus non régulateurs, est devenue majoritaire, atteignant la valeur de 80 %. Par conséquent, les mutants d'algues *npq1* et *npq2*, ayant le cycle de xanthophylles non fonctionnel, étaient plus sensibles aux effets toxiques du dichromate.

4.2 ABSTRACT

The photosystem II activity and energy dissipation was investigated when algal *Chlamydomonas reinhardtii* strains were exposed to dichromate toxicity effect. The exposure during 24h to dichromate effect of two *C. reinhardtii* mutants having non functional xanthophylls cycle, as *npq1* zeaxanthin deficient and *npq2* zeaxanthin accumulating, induced inhibition of PSII electron transport. After dichromate induced toxicity, PSII functions of *C. reinhardtii* mutants were investigated under different light intensities. To determine dichromate toxicity and light intensity effect on PSII functional properties we investigated the change of energy dissipation via PSII electron transport, non photochemical regulated and non regulated energy dissipation according to Kramer et al. (2004). We showed the dependency between dichromate toxicity and light induced photoinhibition in algae deficient in xanthophyll cycle. When algal mutants missing xanthophylls cycle were exposed to dichromate toxicity and to high light intensity, energy dissipation via non regulated mechanism takes the most important pathway reaching the value of 80 %. Therefore, the mutants *npq1* and *npq2* having non functional xanthophylls cycle were more sensitive to dichromate toxic effects.

Keywords : Photosystem II energy dissipation; xanthophyll cycle; zeaxanthin; dichromate; *Chlamydomonas reinhardtii*; MAXI-IMAGING-PAM fluorometry.

4.3 INTRODUCTION

For dichromate effect, it has been found to inhibit photosynthesis process at very low concentration (Wong and Chang 1991; Mallick and Mohn 2003). Sensitive site for chromate effect is closely associated with photosystem II electron transport (Appenroth et al. 2003; Ait Ali et al. 2006; Hörcsik et al. 2007). Dichromate inhibitory site was determined to be located at the PSII reducing side since the photoreduction of DCPIP (2,6-dichlorophenol indophenol) by thylakoid membranes was not recovered after addition of PSII electron donors (DPC, NH_2OH , MnCl_2 and benzidine) (Prasad et al. 1991). It has been shown that when *Spirodela polyrhiza* was affected by dichromate the inhibition site was located between PSII primary electron acceptor Q_A and secondary electron acceptor Q_B . The increase of fluorescence yield at K transient and alteration of oxygen evolving function when *Spirodela polyrhiza* was exposed to dichromate toxic effect were taken as evidences that water splitting system can be another inhibitory site (Susplugas et al. 2000; Appenroth et al. 2001). The evidence has been shown for dichromate inhibition of PSII electron transport in *Lemna gibba* and *Chlorella pyrenoidosa* to be associated with decrease of protein D1 and 33 kDa protein of the oxygen evolving complex. In *Lemna gibba* dichromate effect initiated the increase of reactive oxygen species (ROS) which was found to be closely related to a decrease of D1 protein content (Ait Ali et al. 2006; Hörcsik et al. 2007).

Such dichromate inhibitory effects on PSII appeared to be similar to those caused by ROS formation when algal cells were exposed to high light intensity inducing photoinhibitory effect (Lupinková and Komenda 2004; Nishiyama et al. 2004). The studies of PSII electron transport inhibition by dichromate may indicate possible involvement of PSII photoinhibition process. For other metals as Cu and Cd toxicity effect on PSII of *Phaseolus vulgaris* and *Oryza sativa* was found to accelerate photoinhibition effect and alters D1 protein by different processes such as increasing reactive oxygen species production and altering protein synthesis (Pätsikkä et al. 1998; Singh and Tewari, 2003; Pagliano et al. 2006). Such Cd^{2+} effect on D1 protein in *Oryza sativa* caused important decrease of PSII quantum yield. Photoinhibition process has been characterized by an increase of fluorescence non photochemical quenching (NPQ) value related to heat dissipation (Maxwell and Johnson

2000; Müller et al. 2001). Under such condition this pathway of energy dissipation represents the main regulatory mechanism in preventing photo-inhibitory effect when plants are exposed to excess light energy or toxic effect induced by different xenobiotics. Moreover, it has been shown for metals toxicity effect to change the energy dissipation process which may interfere with photoinhibition as already seen for copper, cadmium and dichromate effects (Pätsikkä et al. 1998; Pagliano et al. 2006; Ait Ali et al. 2006).

It is assumed that photoinhibition process in majority of plants species is regulated by heat energy dissipation via xanthophylls cycle which is dependent to proton gradient closely related to oxido-reduction state of PSII-PSI electron transport (Krause and Jahns 2004). In this process, controlled by enzyme violaxanthin de-epoxidase, violaxanthin is reversibly transformed into zeaxanthin via intermediate antheraxanthin which accepts excitation energy directly from light harvesting antenna chlorophylls, therefore, resulting in non radiative thermal energy dissipation (Horton et al. 1994; Demmig-Adams et al. 1996). However zeaxanthin may react with protein LHC inducing their conformation change which will also result in heat dissipation (Horton et al. 1994; Pospisil 1997). For photosynthesis of higher plants and algal species, it has been indicated to change remarkably the energy dissipation process under different environmental conditions. This effect has been interpreted as result of PSII structural and functional change according to ecological adaptation (Kitao et al. 2003; Garcia-Mendoza et al. 2002; Serôdio et al. 2005). Therefore, further understanding of this process affecting PSII functions may provide valuable information on PSII energy dissipation mechanism. In this report we used *Chlamydomonas reinhardtii* mutants, having reduced non-photochemical quenching property *npq1* and *npq2* (Niyogi et al. 1997; Govindjee and Seufferheld 2002) to investigate dichromate effect on PSII energy dissipation process when algae are exposed to different light intensity. Therefore, the change of PSII function measured under different light intensities when dichromate toxicity has been induced may explain interaction between dichromate toxicity and light intensity on PSII energy dissipation.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 Algal culture

Chlamydomonas reinhardtii algal strains (wild type : CC-400, *npq1* mutant deficient in zeaxanthin : CC-3682 and *npq2* mutant accumulating zeaxanthin : CC-3683) were obtained from the *Chlamydomonas* Genetic Center (Duke University, Durham, NC). The original source and phenotype characterization of *npq1* and *npq2* mutants was described in Niyogi et al. (1997). Cells were cultivated in a batch culture of 1 L high salt (HS) growth medium (Harris 1989) under continuous illumination ($100 \pm 25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by white fluorescent lamps (Sylvania GroLux F 36 W) at $27 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. The algal culture was placed on an orbital shaker (120 rpm) and permanently aerated to obtain constant CO_2 concentration in the growing medium. When the algal culture was in the exponential growth phase, a sample having a cell density of $5 \times 10^7 \text{ cells ml}^{-1}$ was used in this study.

4.4.2 Dichromate treatment

The stock solution of dichromate was made with $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ salt dissolved in HS medium to obtain 20 mM of stock solution. For investigation of dichromate toxicity, treated algal samples were prepared with growth medium in final volume of 100 ml where initial cell density was $3 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$. The algal samples were exposed during 24h to 6, 12.5 and 25 μM of dichromate concentrations. During dichromate treatment samples were placed on an orbital shaker where light intensity and temperature conditions were the same used for growth culture.

4.4.3 Cell growth and chlorophyll determination

Algal cell density was determined by using a Multisizer 3 Coulter Counter (Beckman Coulter). Growth rates were calculated from plots of the \ln of cell number against exposure time to dichromate. Total chlorophyll extraction was done in 100 % of methanol at 65°C and quantitative determination was done according to Lichtenthaler (1987).

4.4.4 Determination of Chlorophyll *a* fluorescence parameters

Prior to fluorescence measurements, treated algal samples were dark-adapted for 15 min to obtain an oxido-reduction equilibrium of PSII-PSI electron transport carriers. Sample of algal cells (8 μg of chlorophyll *a*) were uniformly placed on 13 mm glass fiber filter (Millipore #AP20 013 00) by using low pressure filtration to avoid physiological stress effect and to obtain highly reproducible results according to Dewez et al. (2005).

Chlorophyll fluorescence parameters were measured at room temperature with a pulse-amplitude-modulated fluorescence monitoring system (MAXI-IMAGING-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, Germany) based on the principle of Schreiber et al. (1986). The response of photosynthetic fluorescence parameters to light intensity was determined by using the rapid light curve according to White and Critchley (1999). Algal samples were illuminated with different irradiances of actinic light (from 20 to 1200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), after each exposure of 1 min a 0.8 s saturating light pulse (3000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was applied to obtain maximum light-adapted fluorescence. For used actinic lights different photosynthetic parameters were evaluated. The effective quantum yield of PSII, $Y(\text{II}) = (F_M' - F)/F_M'$ according to Genty et al. (1989). The quantum yield of non-regulated energy dissipation of PSII, $Y(\text{NO}) = 1/(\text{NPQ} + 1 + q_L (F_M/F_0 - 1))$, where non-photochemical quenching value was $\text{NPQ} = (F_M - F_M')/F_M'$. The parameters $q_L = q_P \times F_0'/F$ and $q_P = (F_M' - F)/(F_M' - F_0')$ were used as indicators for fraction of open PSII reaction center participating in electron transport. The quantum yield of regulated energy dissipation of PSII was estimated as $Y(\text{NPQ}) = 1 - Y(\text{II}) - Y(\text{NO})$ according to Kramer et al. (2004). For all those parameters F_0 fluorescence yield was considered when PSII was at maximum level oxidized state (dark adapted state) and the F_0' fluorescence yield was considered when PSII was under light adapted state ($F_0' = F_0/(F_V/F_M + F_0/F_M')$) according to Oxborough and Backer (1997). Numerical values of chlorophyll fluorescence parameters were evaluated by using analytical software (IMAGING-WIN, Walz, Effeltrich, Germany).

4.4.5 Data analysis and statistic

The experiments were down in three replicates for all treatments. Means and standard deviation were estimated for each treatment. Significant differences between controls and Cr treated samples were determined by using Student's *t* test where *p* value less than 0.05 was considered to be significant.

4.5 RESULTS AND DISCUSSION

4.5.1 Growth inhibition and chlorophyll content

Dichromate appeared to be an inhibitor of algal cell growth as we noted by the change of growth rate. When *C. reinhardtii* algae (wild type, *npq1* and *npq2*) were exposed during 24h to dichromate cell growth showed a significant decrease for all genotypes exposed to dichromate concentration of 12,5 and 25 μM (Table 4.1). The chlorophyll concentration per cell of algal culture decreased also significantly for all genotypes indicating that dichromate (12,5 and 25 μM) toxicity altered chlorophyll synthesis or caused a chlorophyll degradation (Table 4.1). This result showed that photosynthesis represents sensitive target for dichromate inhibitory effect. Some evidences have been earlier reported for dichromate to affect photosynthesis shown by the change of PSII fluorescence rapid transients of *Spirodela polyrhiza* (Appenroth et al. 2001). Evidence for dichromate inhibitory effect on protochlorophyllide transformation into chlorophyllide and alteration of PSII light harvesting complex in wheat confirm for dichromate to inhibit of PSII function (Mysliwa-Kurdziel and Strzalka 2005). For the three investigated *C. reinhardtii* genotypes we found to have very different PSII non photochemical quenching capacity when they have been exposed to the same light intensities. For mutants *npq1* and *npq2*, exposed to high light intensity from 700 to 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, it has been determined to have non photochemical quenching (NPQ) values at half and one third compared to wild type respectively (Figure 4.1). For *npq1* and *npq2* mutants, it has been earlier reported to have reduced ability to dissipate energy via non photochemical pathway (Niyogi et al. 1997; Govindjee and Seufferheld 2002). It is important to investigate the change of PSII function under different light intensities when dichromate toxicity has been induced.

4.5.2. Effect of light intensity on PSII function and energy dissipation when algal genotypes have been exposed to dichromate toxicity effect

When *C. reinhardtii* mutants were exposed to dichromate, the electron transport of PSII activity was different if *npq1* and *npq2* mutants were compared to wild type. Here we used the change of qP value to evaluate energy dissipation via PSII electron transport since photochemical quenching values qP indicates PSII reaction centers in open state contributing to electron transport (Rohacek 2002). We found for mutant *npq1* lacking zeaxanthin and exposed to dichromate toxicity to have low capacity in maintaining PSII electron transport (Figure 4.2 B). Under similar condition, wild type and *npq2* mutant accumulating zeaxanthin were relatively similar and more resistant to photoinhibitory effect compared to *npq1*. However when algae were exposed to 12.5 μM dichromate the electron transport of PSII in *npq2* mutant was evidently inhibited under relatively low light intensity (325 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) if compared to wild type (600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), (Figure 4.2 A-C). The effect was even more pronounced when dichromate concentration was increased to 25 μM . The susceptibility of PSII to photoinhibition was earlier found to be correlated to the ratio between open PSII and closed PSII reaction centers (Oquist and Huner 1993). A significant higher probability of PSII photodamage will occur when Q_A is in reduced state, closed PSII reaction centers (Melis, 1999). It has been found when algal specie *Scenedesmus obliquus* were exposed to dichromate inhibitory effect that the decreased ratio of open to closed PSII was resulted in the decrease of qP values (Mallick et Mohn 2003). According to those earlier studies, our results here showed that dichromate accelerated photoinhibition effect (Figure 4.2 A). However, this effect of dichromate was much more evident for mutants *npq1* and *npq2* having non functional xanthophylls cycle (Figure 4.2 B, C).

According to the change of photochemical quenching (Figure 4.2), the efficiency of photochemical energy conversion by PSII, measured with operational quantum yield $Y(\text{II})$, was strongly dependent to light intensity for all investigated algal genotypes (Figure 4.3). We found for the decrease of operational quantum yield caused by photoinhibition to be different when wild type was compared with mutants *npq1* and *npq2*. Complete inhibition of PSII primary photochemistry was induced at 800 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for wild type and for *npq2* mutant characterized earlier to have high content of zeaxanthin was at 900 $\mu\text{mol photons m}^{-2}$

s^{-1} (Niyogi et al. 1997). On the other hand mutant *npq1* (not having zeaxanthin), showed photoinhibition at $500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure 4.3 B). It appeared that *npq2* mutant was more resistant to photoinhibition compared to *npq1* mutant. This finding was in agreement with earlier report showing that *npq1* had rapid degradation of PSII D1 protein under high light intensity (Jahns et al. 2000). In this study we noticed for dichromate effect to increase sensitivity of algae to photoinhibitory effect since the photoinhibition was induced at lower light intensity in algae treated with dichromate. It is worth to notice when algae were exposed to $12.5 \mu\text{M}$ dichromate, that the mutants not having functional xanthophyll cycle, *npq1* (deficient in zeaxanthin) and *npq2* (accumulating zeaxanthin), have complete photoinhibition at $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure 4.3 B-C), while wild type was functional up to $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure 4.3 A). By these evidences we demonstrated for dichromate inhibitory effect on PSII to increase drastically photoinhibition process in algae mutants missing xanthophyll cycle and regardless to the presence or absence of zeaxanthin. The inhibitory effect of heavy metals which increased sensitivity of PSII to light by causing photoinhibition was reported earlier for *Phaseolus vulgaris* and *Oryza sativa* exposed to Cu and Cd respectively. Those effects were associated with deterioration of D1 protein functions causing an important decrease of PSII quantum yield resulting from the change of proportion of functional PSII reaction centers (Pätsikkä et al. 1998; Pagliano et al. 2006).

Decrease of the operational quantum yield caused by dichromate effect on algae may affect also energy-dissipation via non-photochemical pathway. Therefore, it was of interest to investigate how dichromate may affects regulatory energy dissipation process concerning xanthophyll cycle and carotenoids, Y(NPQ), and non regulatory process, Y(NO) which is competitive mechanisms of energy dissipation (Kramer et al. 2004). As those dissipative pathways of absorbed light energy via excited state of chlorophyll are complementary to each other, it is expected that the decrease of energy through one way will increase dissipation via the other pathways (including the photochemical one). It is considered for Y(NPQ) to represent PSII energy dissipation via regulated mechanism concerning xanthophylls cycle and carotenoids. However, the fraction of energy which is not dissipated by this mechanism, Y(NO), is considered to be energy dissipation via non regulated processes (Kramer et al. 2004). In this study for all *C. reinhardtii* algal strains, not exposed to dichromate effect, one

may expect to see this interdependence between those different energy dissipation pathways. As we noticed, when light energy was increased causing diminished PSII operational quantum yield, $Y(II)$, the regulated energy dissipation was gradually increased as light intensity was increased (Figure 4.3 and 4.4 : A-C). When wild type algae were exposed to dichromate toxic effects up to 25 μM , the energy dissipation via regulatory pathway was gradually decreased. We may interpret this to be caused by the decrease of electron-protons transport and consequently it may delay the xanthophyll cycle, since pH gradient is essential for this cycle. However, this does not exclude direct inhibitory effect of dichromate on xanthophyll de-epoxidation process as earlier reported for cadmium (Bertrand et al. 2001).

We found for all genotypes that high dichromate concentrations (example 25 μM) induced a strong increase of energy dissipation via $Y(NO)$ as non regulated pathway (Figure 4.4). For *npq1* mutant, having high sensitivity to light inhibition of electron transport, it has been found to have strong energy dissipation via regulatory, $Y(NPQ)$ and non regulated pathway, $Y(NO)$, mechanisms. We noticed that non regulated pathways was more important compared to other ways of energy dissipation (Figure 4.4 B, E). If algae are not exposed to dichromate toxicity, the sensitivity to photoinhibition was very similar comparing mutant *npq2* (not having xanthophyll cycle but having high accumulation of zeaxanthin) with wild type. However, sensitivity to photoinhibition of *npq2* mutant appeared to be evident when it has been exposed to Cr toxic effects. For this *npq2* mutant exposed to high concentrations of dichromate (12.5 and 25 μM) regulated non photochemical energy dissipation, $Y(NPQ)$, appeared only under high light intensity (Figure 4.4 C). Similarly to *npq1*, mutant *npq2* demonstrated for dichromate toxicity effect to induce mostly PSII energy dissipation via non regulated pathway, $Y(NO)$, (Figure 4.4 F). This discrepancy was found for all investigated genotypes of *C. reinhardtii* which indicate for dichromate to trigger energy dissipation via non regulated pathway. We demonstrated here for three *C. reinhardtii* genotypes to have very different sensitivity to dichromate toxic effect and also characteristic pathways of energy dissipation. If we consider that PSII energy distribution via $Y(II)$, $Y(NPQ)$ and $Y(NO)$ represents 100 % of absorbed light energy by light harvesting complex, according to earlier investigation (Kramer et al. 2004), therefore, the investigation of energy dissipation under different light intensity will indicate dichromate toxicity effect on regulatory and non

regulatory energy dissipation pathways. Here we investigated dichromate toxicity effect on distribution of energy dissipation way when three genotypes of *C. reinhardtii* were exposed to relatively low ($100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and high light intensity ($530 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), (Figure 4.5 A and B). We found for wild type of *C. reinhardtii*, exposed to low intensity and not treated by dichromate, to have efficient PSII electron transport with participation of $Y(\text{II})=50\%$ compared to total energy dissipation as $Y(\text{II})+Y(\text{NPQ})+Y(\text{NO})=100\%$. Under the same conditions, for *npq1* and *npq2* mutants PSII functional quantum yield was only 9 % and 33 % respectively. Both mutants demonstrated high values of non regulated energy dissipation since having for $Y(\text{NO})$ 77 % (*npq1*) and 62 % (*npq2*). When dichromate toxic effect was induced either by 6 and 12.5 μM , we found for $Y(\text{NO})$ to increase significantly in wild type and *npq2* mutant (Figure 4.5 A). We should mention that *C. reinhardtii* genotypes were adapted and grown under $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, therefore, when those algae were exposed to relatively high light intensity ($530 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), the energy dissipation was evidently different since operational quantum yield for all genotypes were decreased for 3 to 4 times, while, regulated and non regulated pathways were increased. Under those conditions, dichromate toxicity by inducing inhibition of PSII electron transport in mutants, *npq1* and *npq2*, forced the majority of light energy to be dissipated through non regulated pathway as estimated by $Y(\text{NO})$ values (Figure 4.5 B, Figure 4.6). This result gave evidence for algal genotype *npq1*, lacking xanthophyll cycle, to be highly sensitive to photoinhibitory effect. However less sensitivity to photoinhibitory effect found for *npq2* mutant not having xanthophylls cycle either, we may interpret to be result of possible photoprotection by accumulated zeaxanthin which may participate to energy dissipation by a mechanism not well understood (Jahns et al. 2000; Goovindgee and Seufferheld 2002). This is in agreement with earlier findings for zeaxanthin to may interact directly with chlorophyll antenna complex and preventing ROS formation which may contribute to photoinhibition (Demmig-Adams et al. 1996; Pospisil 1997). However, such role of energy dissipation does not prevent photoinhibitory effect when *npq2* mutant was exposed to dichromate inhibitory effect. The evidence supporting this interpretation was recently shown by dichromate effect to induce alteration of PSII D1 protein and ROS formation in *Lemna gibba* and *Chlorella pyrenoidosa* (Ait Ali et al. 2006; Hörceik et al. 2007). We demonstrated here evidence that when algal genotypes missing xanthophyll cycle and exposed to high light intensity, energy dissipation

via non regulated mechanism is the major dissipation pathway reaching 75 % of total absorbed light energy. Under similar light condition, when those genotypes were exposed to dichromate inhibiting PSII electron transport, non regulated energy dissipation may increase up to 80 % (Figure 4.6). Therefore, the response of mutants *npq1* and *npq2* to dichromate effect confirmed for the presence of functional xanthophyll cycle to be essential in preventing photoinhibition.

4.6 ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Natural Science and Engineering Council of Canada (NSERC) through Grant GP0093404 awarded to R. Popovic.

4.7 REFERENCES

- Ait Ali, N., D. Dewez, O. Didur and R. Popovic. 2006. "Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of D1 protein and oxygen evolving complex". *Photosynth. Res.*, vol. 89, p. 81-87.
- Appenroth, K.J., J. Stöckel, A. Srivastava and R. J. Strasser. 2001. "Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurements". *Environ. Pollut.*, vol. 115, p. 49-64.
- Appenroth, K. J., A. Keresztes, E. Sarvari, A Jaglarz and W. Fischer. 2003. "Multiple effects of chromate on *Spirodela polyrhiza* : electron microscopy and biochemical investigations". *Plant Biol.*, vol. 5, p. 315-323.
- Bertrand, M., B. Schoefs, P. Siffel, K. Rohacek and I. Molnar. 2001. "Cadmium inhibits epoxidation of diatoxanthin to diadinoxanthin in the \square pparatus \square ls cycle of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*". *FEBS Lett.*, vol. 508, p. 153-156.
- Dewez, D., L. Geoffrey, V. Guy and R Popovic. 2005. "Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper ions and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 74, p. 150-159.
- Demmig-Adams, B., A. M. Gilmore and W. W. Adams. 1996. "In vivo functions of carotenoids in higher plants". *FASEB J.*, vol. 10, p. 403-412.
- Garcia-Mendoza, E., H. C. Matthijs, H. Schubert and L. R. Mur. 2002. "Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlorella fusca* acclimated to constant and dynamic light conditions". *Photosynth. Res.*, vol. 74, p. 303-315.

- Genty, B., J. M. Briantais and N. R. Baker. 1989. "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 990, p. 87-92.
- Govindjee and M. Seufferheld. 2002. "Non-photochemical quenching of chlorophyll *a* fluorescence : early history and characterization of two xanthophylls-cycle mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Funct. Plant Biol.*, vol. 29, p. 1141-1155.
- Harris, E. H. 1989. "The *Chlamydomonas* Sourcebook : A comprehensive guide to biology and laboratory use". San Diego: Academic Press, pp. 780.
- Horton, P., A. V. Ruban and R. G. Walters. 1994. "Regulation of light harvesting in green plants". *Plant Physiol.*, vol. 106, p. 415-420.
- Hörcsik, Z. T., L. Kovacs, R. Laposi, I. Meszaros, G. Lakatos and G. Garab. 2007. "Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*". *Photosynthetica*, vol. 45, p. 65-69.
- Jahns, P., B. Depka and A. Trebst. 2000. "Xanthophyll cycle mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* indicate a role for zeaxanthin in the D1 protein turnover". *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 38, p. 371-376.
- Kitao, M., H. Utsugi, S. Kuramoto, R. Tabuchi, K. Fujimoto and S. Lihpai. 2003. "Light-dependent photosynthetic characteristics indicated by chlorophyll fluorescence in five mangrove species native to Pohnpei Island, Micronesia". *Physiol. Plant*, vol. 117, p. 376-382.
- Kramer, D. M., G. Johnson, O. Kiirats and G. E. Edwards. 2004. "New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes". *Photosynth. Res.*, vol. 79, p. 209-218.
- Krause, G. H. and P. Jahns. 2004. "Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching : characterization and function". In *chlorophyll a fluorescence : a signature of photosynthesis*. Editors, G. C. Papageorgious and Govindjee. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p 463-495..
- Lichtenthaler, H. K. 1987. "Chlorophylls and caretonoids : pigments of photosynthetic biomembranes". In *Methods in enzymology*. Editors L. Packer and R. Douce. London: Academic Press, vol. 148, p. 350-382.
- Lupinková, L. and J. Komenda. 2004. "Oxidative modifications of the photosystem II D1 protein by reactive oxygen species : from isolated protein to Cyanobacterial cells". *Photochem. Photobiol.*, vol. 79, p.152-162.

- Mallick, N. and F. H. Mohn. 2003. "Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 55, p. 64-69.
- Maxwell, K. and G. N. Johnson. 2000. "Chlorophyll fluorescence-a practical guide". *J. Exp. Bot.*, vol. 345, p. 659-668.
- Melis, A. 1999. "Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts : what modulates the rate of photodamage? ". *Trends Plant Sci.*, vol. 4, p. 130-135.
- Müller, P., Li, X. P. and K. K. Niyogi. 2001. "Non-photochemical quenching : a response to excess light energy". *Plant Physiol.*, vol. 125, p.1558-1566.
- Mysliwa-Kurdziel, B. And K. Strzalka. 2005. "Influence of Cd(II), Cr(VI) and Fe(III) on early steps of deetiolation process in wheat: fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide". *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 106, p.199-207.
- Nishiyama, Y., S. I. Allakhverdiev, H. Yamamoto, H. Hayashi and N. Murata. 2004. "Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803". *Biochemistry*, vol. 43, p. 11321-11330.
- Niyogi, K. K., O. Bjorkman and A. R. Grossman. 1997. "*Chlamydomonas* xanthophylls cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching". *Plant Cell*, vol. 8, p. 1369-1380.
- Oquist, G. and N. P. A. Huner. 1993. "Cold-hardening-induced resistance to photoinhibition of photosynthesis in winter rye dependent upon an increased capacity for photosynthesis". *Planta*, vol. 189, p. 150-156.
- Oxborough, K. and N. R. Baker. 1997. "Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components-calculation of qP and F_v'/F_m without measuring F_0 ". *Photosynth. Res.*, vol. 54, p. 135-142.
- Pagliano, C., M. Raviolo, F. D. Vecchia, R. Gabbrielli, C. Gonnelli, N. Rascio, R. Barbato and N. La Rocca. 2006. "Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.) ". *J. Photochem. Photobiol.*, vol. 84, p. 70-78.
- Pätsikkä, E., E. Aro and E. Tyystjärvi. 1998. "Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo". *Plant Physiol.*, vol. 117, p. 619-627.
- Pospisil, P. 1997. "Mechanisms of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in higher plants". *Photosynthetica*, vol. 34, p. 343-355.

- Prasad, S. M., J. B. Singh, L. C. Rai and H. D. Kumar. 1991. "Metal-induced inhibition of photosynthetic electron transport chain of the cyanobacterium *Nostoc muscorum*". *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 82, p. 95-100.
- Rohacek, K. 2002. "Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships". *Photosynthetica*, vol. 40, p. 13-29.
- Schreiber, U., U. Schliwa and W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical $\Phi_{\text{P}}/\Phi_{\text{F}}$ fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynth. Res.*, vol. 10, p. 51-62.
- Serôdio, J., S. Cruz, S. Vieira and V. Brotas. 2005. "Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and operation of the $\Phi_{\text{P}}/\Phi_{\text{F}}$ cycle in estuarine microphytobenthos". *J. Exp. Marine Biol. Ecol.*, vol. 326, p. 157-169.
- Singh, P. K. and R. K. Tewari. 2003. "Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants". *J. Environ. Biol.*, vol. 24, p. 107-112.
- Susplugas, S., A. Srivastava and R. J. Strasser. 2000. "Changes in the photosynthetic activities during several stages of vegetative growth of *Spirodela polyrrhiza* : Effect of dichromate". *J. Plant Physiol.*, vol. 157, p. 503-512.
- White, A. J. and C. Critchley. 1999. "Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus". *Photosynth. Res.*, vol. 59, p. 63-72.
- Wong, P. K. and L. Chang. 1991. "Effect of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll *a* synthesis of *chlorella pyrenoidosa* 251". *Environ. Pollut.*, vol. 72, p. 127-139.

Table 4.1. Inhibitory effect of dichromate on cell growth and chlorophyll synthesis when *C. reinhardtii* algae were exposed 24h.

Dichromate concentration	Wild type		<i>npq1</i> mutant		<i>npq2</i> mutant	
	Growth rate (day ⁻¹)	Chlorophyll (µg 10 ⁻⁷ cell)	Growth rate (day ⁻¹)	Chlorophyll (µg 10 ⁻⁷ cell)	Growth rate (day ⁻¹)	Chlorophyll (µg 10 ⁻⁷ cell)
Control	1,120 ± 0,160	8,63 ± 0,70	0,350 ± 0,073	6,4 ± 0,52	0,578 ± 0,120	7,20 ± 0,80
6 µM	0,883 ± 0,127	8,56 ± 0,91	0,086 ± 0,076	4,95 ± 0,44	0,250 ± 0,061	5,65 ± 0,71
12,5 µM	0,763 ± 0,092	6,31 ± 0,72	0,064 ± 0,063	4,90 ± 0,61	0,124 ± 0,054	4,63 ± 0,23
25 µM	0,660 ± 0,119	6,00 ± 0,63	-0,026 ± 0,09	4,24 ± 0,34	0,029 ± 0,039	3,93 ± 0,26

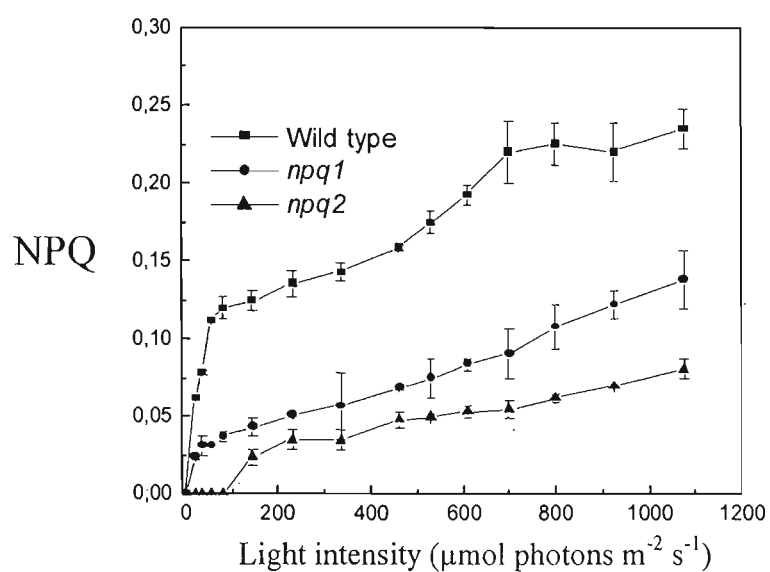


Figure 4.1 : Effect of increased light intensity on non photochemical energy dissipation estimated by non photochemical quenching (NPQ) of variable chlorophyll fluorescence.

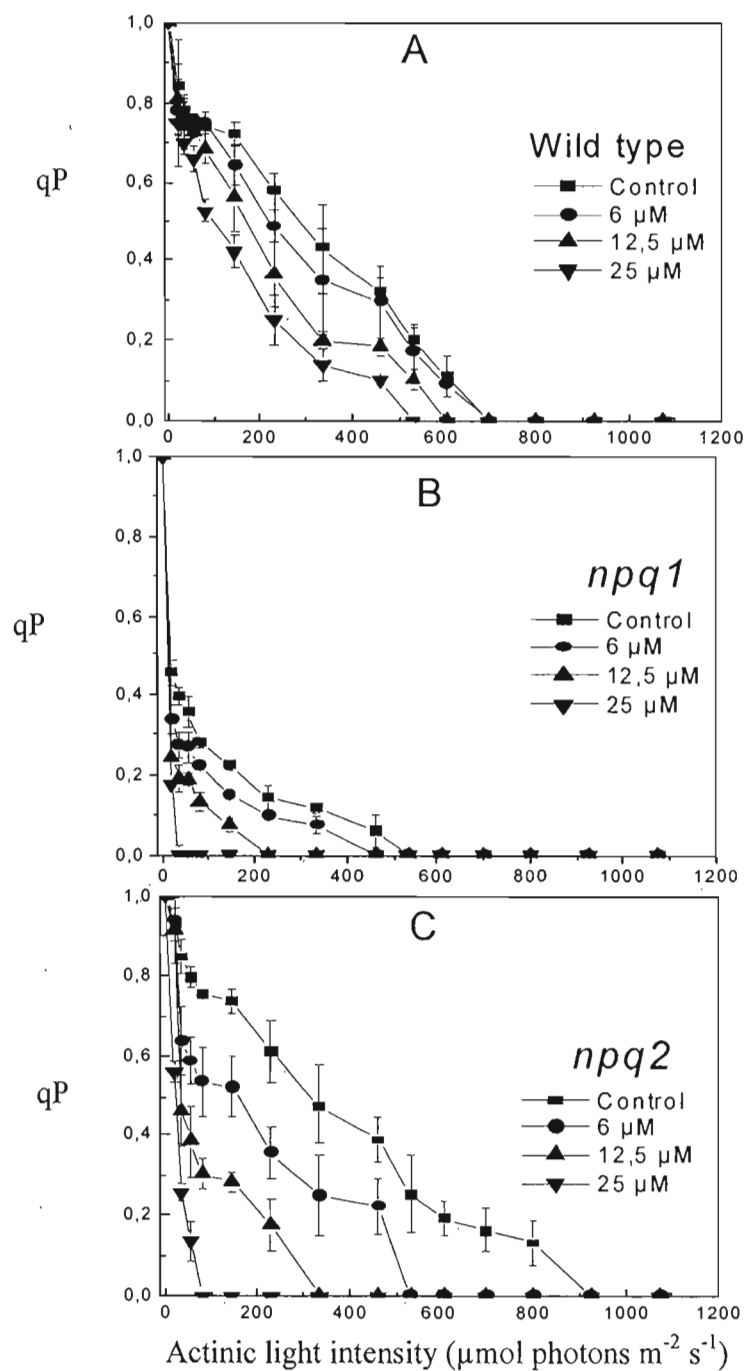


Figure 4.2 The change of photochemical quenching (qP) of variable chlorophyll fluorescence in relation to light intensities when *C. reinhardtii* algae were exposed 24h to dichromate. For more details, see material and methods.

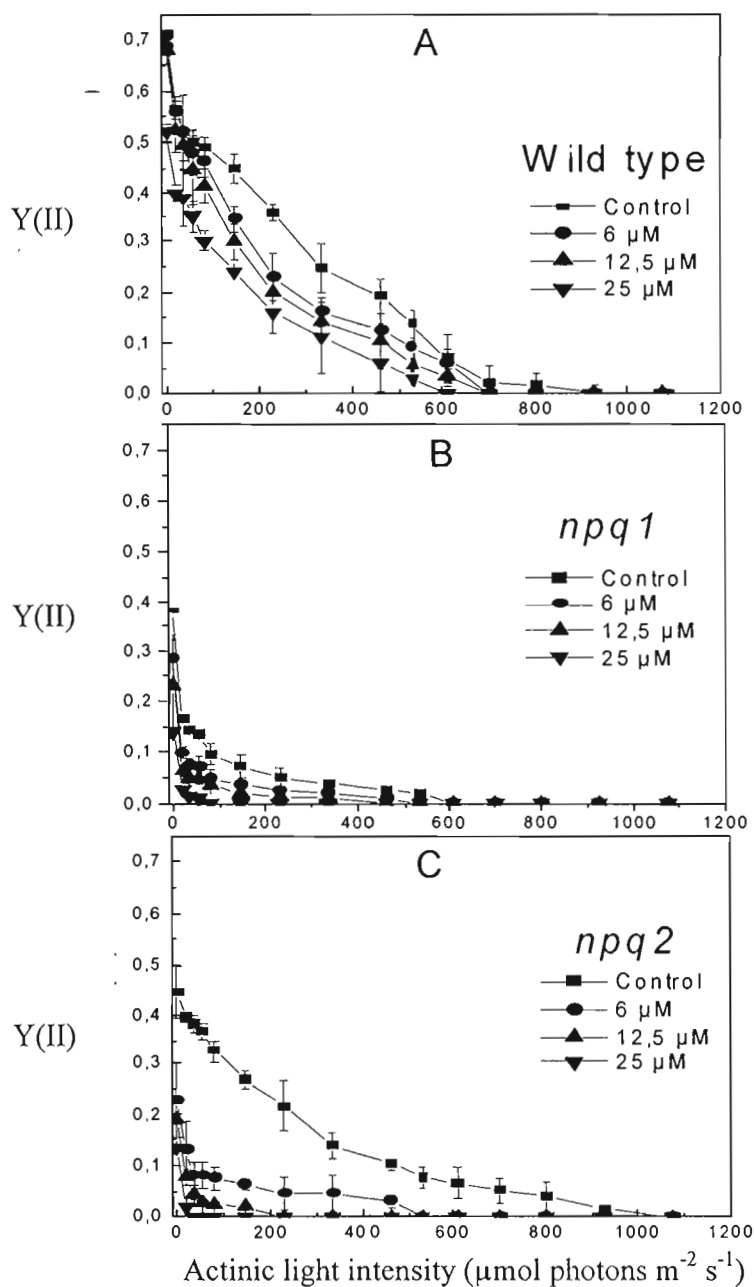


Figure 4.3: The change of the effective quantum yield $Y(II)$ of photochemical energy conversion in PSII in relation to light intensities when *C. reinhardtii* algae were exposed 24h to dichromate.

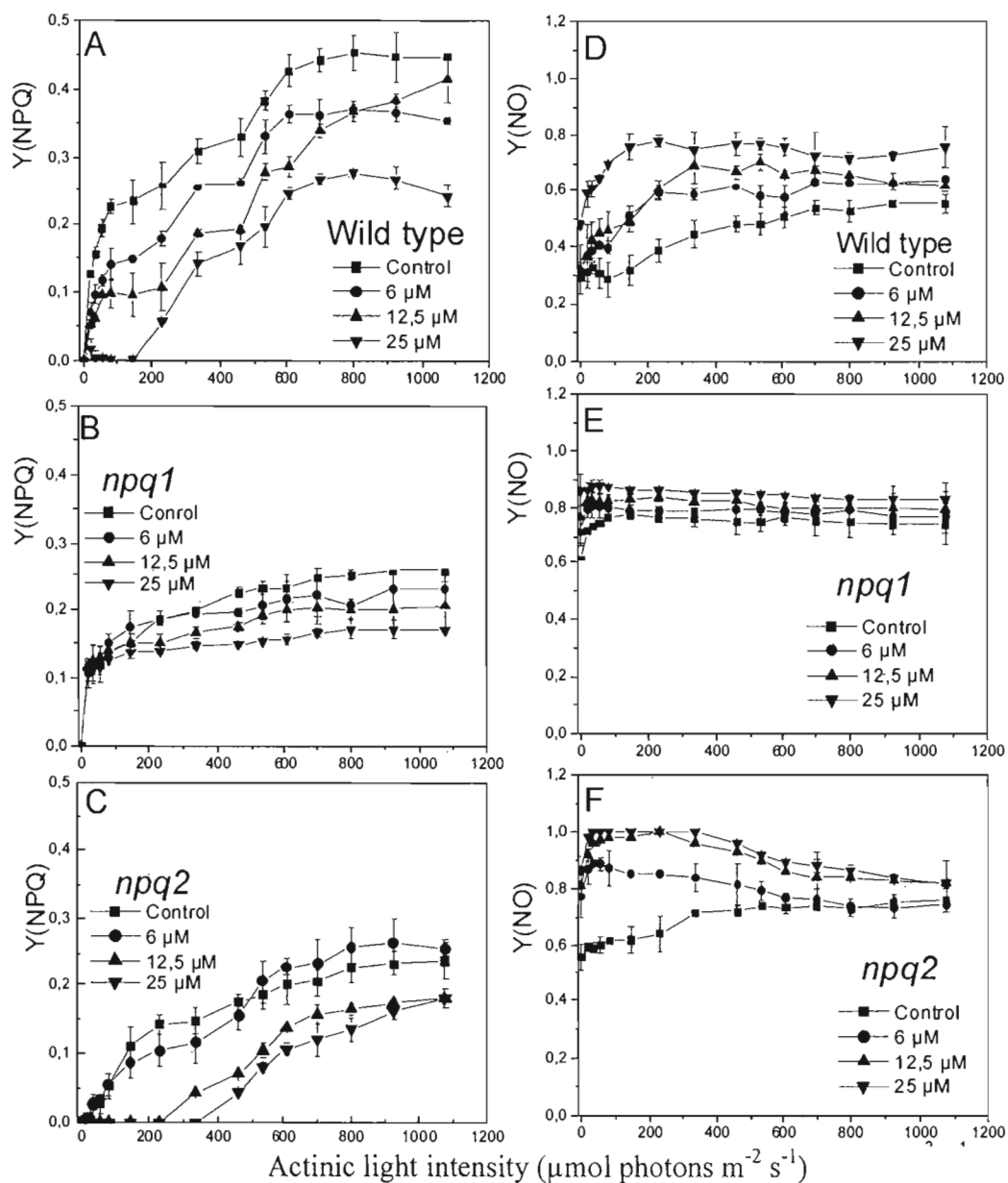


Figure 4.4 : The change of non photochemical energy dissipation pathways in relation to light intensities, noted as $Y(\text{NPQ})$ for the quantum yield of regulated energy dissipation in PSII and $Y(\text{NO})$ for the quantum yield of non-regulated energy dissipation in PSII, when *C. reinhardtii* algae were exposed 24h to dichromate.

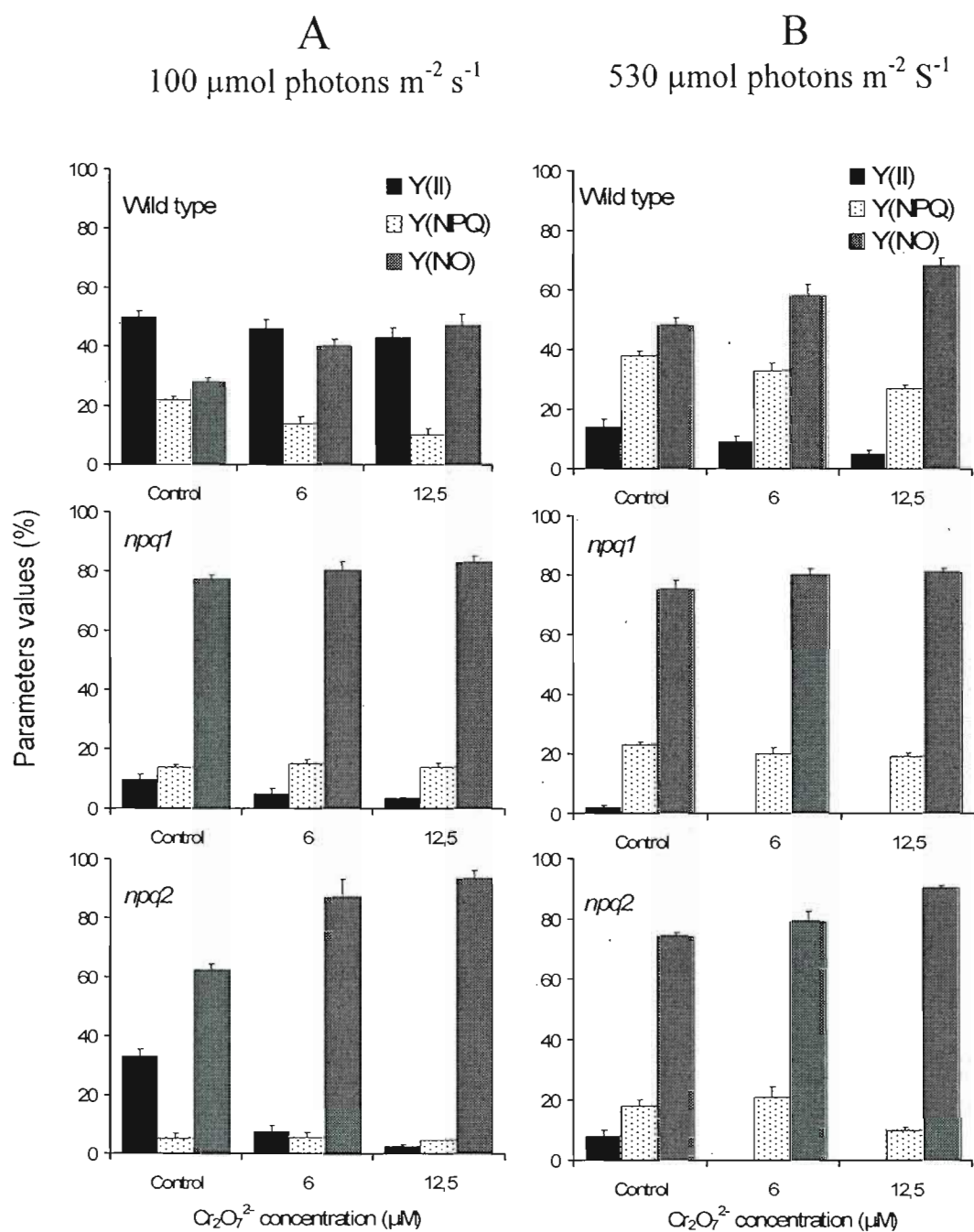


Figure 4.5. Effect of low and high light intensity on PSII energy dissipation pathways when *C. reinhardtii* algae were exposed 24h to dichromate. Numbers represent percentage of the total energy dissipation.

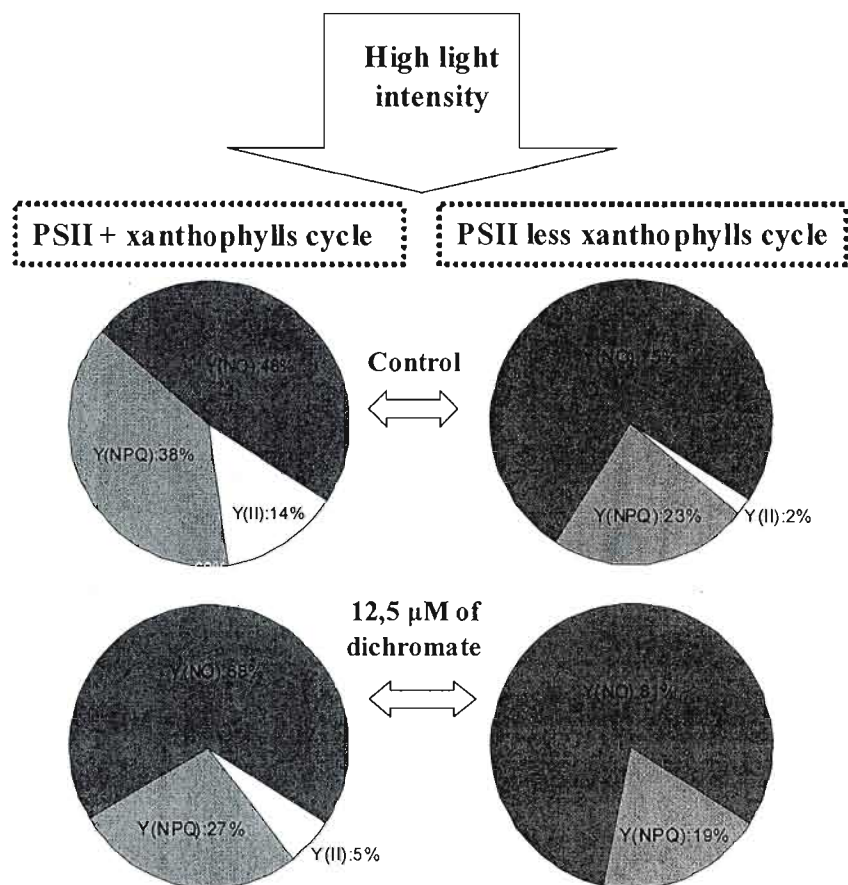


Figure 4.6 : Photochemical energy conversion (white), non-photochemical energy dissipation via regulatory (open grey) and non-regulatory (dark grey) mechanisms of PSII for *C. reinhardtii* algae having or not functional xanthophyll cycle.

CHAPITRE V

PHOTOSYNTHETIC PARAMETERS AS INDICATORS OF TRINITROTOLUENE (TNT) INHIBITORY EFFECT : CHANGE IN CHLOROPHYLL A FLUORESCENCE INDUCTION UPON EXPOSURE OF *LACTUCA SATIVA* TO TNT

Nadia Ait Ali^{1,3}, David Dewez^{1,3}, Pierre Yves Robidoux^{2,3} and Radovan Popovic^{1,3*}

¹Département de chimie, Université du Québec à Montréal, 2101 rue Jeanne-Mance, Montréal, QC, CANADA, H2X 2J6

²Applied Ecotoxicology Group, Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montreal, Quebec, Canada, H4P 2R2

³Centre TOXEN – Centre de recherche en toxicologie de l'environnement, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC

*Corresponding author.

Published at Ecotoxicology, 15: 437-441, 2006

5.1 RÉSUMÉ

Le trinitrotoluène, utilisé comme composant d'explosifs conventionnels, peut induire des effets inhibiteurs de la croissance des plantes terrestres. L'activité photosynthétique de *Lactuca sativa* a été mesurée, en utilisant la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne et la fluorométrie modulée, quand cette plante a été exposée à différentes concentrations de trinitrotoluène (comprises entre 32 et 1000 mg/kg). Les résultats ont montré une diminution de la fluorescence variable, provoquée par la désactivation des centres réactionnels du photosystème II. Ainsi, nous avons établi que la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne constitue un indicateur utile pour évaluer l'effet inhibiteur du trinitrotoluène sur la réaction photochimique primaire du photosystème II et le transport d'électrons. Les paramètres photosynthétiques de la fluorescence, associés à l'état de réduction du photosystème II et à la dissipation non photochimique de l'excès de l'énergie lumineuse, ont montré une forte dépendance entre l'inhibition de l'activité du photosystème II et la concentration de trinitrotoluène. Ce changement des paramètres photosynthétiques de fluorescence, induit par le trinitrotoluène, était une indication fiable de l'état physiologique des plantes. Par conséquent, nous proposons que l'état de réduction du photosystème II et la dissipation non photochimique de l'énergie représentent tous deux des indicateurs utiles dans les bioessais pour la détection des effets toxiques du trinitrotoluène dans les sols pollués.

5.2 ABSTRACT

Trinitrotoluene, as a compound of conventional explosive, may cause inhibitory effect on terrestrial plants. When *Lactuca sativa* was exposed to different concentrations of trinitrotoluene (32 to 1000 mg/kg), photosynthetic process was investigated by using rapid chlorophyll fluorescence kinetic and pulse modulated fluorometry. The decrease of chlorophyll *a* variable fluorescence was seen to be caused by the deactivation of photosystem II reaction centers. We found the rapid variable fluorescence to be a useful indicator to evaluate the inhibitory effect of trinitrotoluene on photosystem II primary photochemistry and electron transport. The fluorescence parameters, related to the reduction state of photosystem II and to non-photochemical dissipation of light energy, showed a strong relation between the inhibitory effect of photosystem II activity and concentration of trinitrotoluene. The change of photosynthetic fluorescence parameters induced by trinitrotoluene was a reliable indication of the plant physiological state. We proposed for the reduction state of photosystem II and the non-photochemical energy dissipation to be a useful tool in bioassay toxicity testing of trinitrotoluene polluted soil.

Keywords : Trinitrotoluene toxicity; *Lactuca sativa*; bioassay; chlorophyll *a* fluorescence; PAM fluorometry; PEA fluorometry

5.3 INTRODUCTION

Trinitrotoluene (TNT) is frequently released into the soil environment by military and mining activities. TNT has also several applications in production of dyestuffs and photographic chemicals which may contribute to its presence as an environmental pollutant (Talmage et al., 1999). In polluted soil, concentration of TNT may vary from 0.07 to 28.6 mg/Kg, and sometimes it was found to have 4000-12000 mg/Kg (Boopathy et al., 2000; Lee et al., 2002). Therefore, contamination of soil by TNT has become an environmental problem for different field sites (Siciliano et al., 2000).

TNT is known to induce a toxic effect on different plant species affecting plant biomass growth (Krishnan et al., 2000; Robidoux et al., 2003). TNT toxicity was found to induce a diminution of photosynthetic activity as noticed for algae *Dictyosphaerium chlorelloides* (Altamirano et al., 2004). Photosynthesis evaluated by the variable chlorophyll *a* fluorescence is considered to be a very sensitive biomarker when plant has been exposed to pollutants toxic effect (Mallick and Mohn, 2003; Popovic et al., 2003). Measurements of chlorophyll *a* fluorescence by the Pulse Amplitude Modulated (PAM) fluorometer and the Plant Efficiency Analyser (PEA) are non-destructive and efficient tools for *in vivo* monitoring of the photosynthetic activity (Lazár, 1999; Rohacek, 2002). Since TNT toxic effect decrease the biomass growth of plants, measurement of photosynthesis may represent a sensitive indicator for the presence of this pollutant in the environment. When plant is exposed to pollutant toxicity, the most sensitive process in photosynthesis is photosystem II (PSII) photochemistry which supports photosynthetic electron transport. The photosynthetic electron transport starting from PSII oxygen evolving system toward photosystem I and NADPH synthesis is responsible for energy storage through different biochemical and physiological processes (Cruz et al., 2005). Therefore, dissipation of energy via PSII chlorophyll *a* fluorescence may represent a valuable physiological biomarker for TNT toxic effect. Furthermore, for different plant species, herbicides, such as, betazone and fluorochloridone or heavy metals have been shown to induce alteration of the chlorophyll *a* fluorescence induction as indication of toxicity effect (Christensen et al., 2003; Juneau et al., 2002).

In this report, we investigated the toxic effect of TNT on primary photosynthetic process by analyzing the change of chlorophyll *a* fluorescence kinetics and corresponding fluorescence parameters when *Lactuca sativa* has been exposed to TNT. Therefore, we used the chlorophyll fluorescence of *L. sativa* as a sensitive indicator for the rapid evaluation of TNT toxic effect in polluted soil.

5.4 MATERIALS AND METHODS

5.4.1 Soil contamination by TNT

The soil used for bioassay experiments was composed of inorganic (86.8 % sand, 11.2 % silt and 2 % clay) and organic component (23 %) having a pH of 7.9 (Table 5.1). The chemical analysis of the soil used in the present experiment did not indicate the presence of organic or inorganic pollutants able to induce toxic effects on plant (data not shown).

Stock solution of TNT was prepared in acetone at a concentration of 20 g/L. For TNT treatments, 50 ml acetone containing different concentrations of TNT was added and homogenized with 1.2 kg of soil to obtain initial concentrations of 32, 100, 320 and 1000 mg of TNT /Kg dry soil. For control sample, we used soil treated only with 50 ml of acetone. Control and TNT treated soils samples were left during 72h in the dark to avoid photodegradation of TNT and to evaporate acetone as a solvent carrier for TNT.

5.4.2 Plant growth conditions

The plant growth and exposure to pollutant effect were done according to ASTM experimental protocol (ASTM, 1999). Twenty seeds of *Lactuca sativa* (provided by CEROM : Centre de Apparatus sur les graines, St-Bruno-de Montarville, Prov. Of Quebec, Canada) were germinated in container having 125 g of soil. Every container has been hydrated with 80 ml of deionized water. Every sample was isolated in individual polyethylene bag to prevent drought stress. *L. sativa* seedlings were grown during 14 days in environmental chamber having a light intensity of 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (photoperiod

cycle : 16h light / 8h dark) and a temperature of 25°C. Those conditions provided optimal growth rate during 14 days. Plant samples were analyzed after 14 days of growth and exposure to TNT.

5.4.3 Chlorophyll *a* fluorescence measurement

Prior to chlorophyll *a* fluorescence measurements, leaves of *L. sativa* were dark-adapted for 30 min to obtain oxido-reduction equilibrium of PSII-PSI electron transport carriers (Horton and Hague, 1988).

The Pulse Amplitude Modulated (PAM) fluorometer (FMS/2S, Hansatech® Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK) was used to analyze fluorescence induction of chlorophyll *a*, where modulated light was $0.02 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the saturating white light pulse was $3600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (duration of 0.5 second) and the actinic light was $180 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. PAM photosynthetic parameters were determined according to Rohacek (2002) : the constant fluorescence F_0 and the maximal fluorescence yield F_M induced by a saturating light pulse for dark adapted plant were used to evaluate the variable fluorescence $F_V = F_M - F_0$. This variable fluorescence represents PSII reaction centers at maximal reduced state after dark adaptation. At steady state of variable fluorescence induced by actinic light, PSII in functional open state was evaluated as $F'_M - F_S$, where F'_M represents the maximum fluorescence yield induced by a saturating flash when leaves were exposed to continuous actinic light. The value of F_S represents the level of fluorescence yield when leaf was exposed to continuous actinic light indicating PSII which does not participate in electron transport. Thus, $F'_M - F_S$ represent the fraction of PSII reaction centers participating in electron transport at steady state of variable fluorescence. Fluorescence quenching caused by the non-photochemical dissipation of absorbed light energy was evaluated as $qN = 1 - [(F'_M - F'_O) / (F_M - F_0)]$, where F'_O represents the fluorescence level in the presence of far-red light permitting maximum oxidized state of PSII-PSI electron transport (Schreiber *et al.*, 1986; Rohacek and Bartak, 1999).

The Plant Efficiency Analyzer fluorometer (PEA, Hansatech® Ltd., UK) was used to measure the rapid polyphasic chlorophyll *a* fluorescence kinetic. The fluorescence yield was monitored up to 6 sec and the fluorescence transients were determined according to Strasser *et al.*, (1999). The fluorescence yield at 50 μ s was considered to be F_0 value, noted as $F_{50\mu s}$; the maximum fluorescence yield F_P was obtained by using a saturating light intensity of 3000 μ mol $m^{-2} s^{-1}$ and variable fluorescence yields related to J and I transients were determined at 2 (F_{2ms}) and 30 ms (F_{30ms}) respectively.

5.4.4 Data analysis and statistics

Experiments were done at least in four replicates per treatments using similar test conditions for all bioassays. Standard deviation and means were calculated for each treatment. Significant differences between controls and contaminated samples were determined by the Tukey test where P values <0.05 were considered significant.

5.5 RESULTS AND DISCUSSION

5.5.1 Effect of TNT on biomass and photosynthetic activity of *L. sativa*

The effect of TNT treatments on the biomass growth of *L. sativa* are shown in Figure 5.1. The growth of *L. sativa* was significantly affected by TNT at concentration higher than 32 mg/kg ($p < 0.05$). For TNT concentration at 100 and 1000 mg/Kg, inhibition of biomass growth was 40 and 70 %, respectively compared to control. Growth inhibition induced by TNT was also earlier noticed in different terrestrial plant species as *Avena sativa*, *Triticum aestivum* and *Brassica rapa* (Gong *et al.*, 1999).

Photosynthetic electron transport appeared also to be affected since fluorescence yield of the rapid fluorescence induction was quenched (Figure 5.2). The fluorescence transients J, I and P were always distinguishable for *L. sativa* exposed from 32 to 1000 mg/kg. The kinetic of fluorescence yield did not indicate a DCMU (Diuron herbicide) type of effect (Dewez *et al.*, 2002), which may show that the inhibitory effect of TNT indicated a deterioration of PSII function associated to the water splitting system. The change of total

fluorescence yield was recently used as an indication of TNT toxic effect on alga *Dictyosphaerium chlorelloides* (Altamirano et al., 2004). However, the fluorescence yield was not related to different photosynthetic-fluorescence parameters which may have different sensitivity to TNT toxic effect.

Chlorophyll *a* fluorescence of *L. sativa* treated with TNT, measured by the PAM method, indicated a strong quenching effect at the maximum fluorescence yield for dark (F_M) and light (F'_M) adapted states (Figure 5.3 A). This quenching effect of the maximum fluorescence yield indicated that TNT inhibitory effect was associated with photosystem II (PSII) primary photochemistry. The increase of fluorescence dissipation at F_O level when *L. sativa* was exposed to TNT effect may indicate an alteration of PSII light harvesting complex (Figure 5.3 B). This effect may decrease the energy transfer from light harvesting complex to PSII reaction centers. Since TNT caused a strong decrease on variable fluorescence, the proportion of active PSII reaction centers was also decreased.

The decrease of variable fluorescence of *L. sativa* in dark adapted state was proportional to the decrease of variable fluorescence at light adapted state. Therefore, most of photosynthetic-fluorescence parameters based on the ratio between maximal and variable fluorescence did not change during TNT effect (result not shown). Consequently, photosynthetic-fluorescence parameters based on this ratio can not be used as a toxicity index. The effect of TNT was evidently noticed by the decrease of the fluorescence yield showing the reduction state of PSII either after dark or light adaptation. Therefore, the functional state of PSII which can be reduced in both cases was decreased by the TNT effect (Figure 5.4 A). One may suppose for the decrease of PSII photochemistry to induce the increase of dissipation of the absorbed light energy via non-photochemical pathway. Indeed, we found for TNT to increase the non-photochemical energy dissipation for more than 250 percent when *L. sativa* was treated with high concentration of TNT (1000 mg/kg), (Figure 5.4 B). The increase of the non-photochemical energy dissipation by TNT demonstrates an evident deterioration of PSII photochemical energy storage. Under those conditions, the PSII complex passed through a dissipative conformation which permitted for an important part of absorbed light energy to be dissipated as heat when photosynthetic electron transport is inhibited (Critchley, 1998; Muller et al., 2001).

In conclusion, the biomass growth of *L. sativa* was strongly decreased when PSII primary photochemistry and electron transport activity was affected by TNT. It appeared that the inhibitory effect of TNT measured by the response of photosynthetic-fluorescence parameters may provide valuable information for the evaluation of TNT toxicity. Therefore, the investigation of those photosynthetic-fluorescence parameters may provide useful information to use chlorophyll fluorescence of lettuce for the evaluation of TNT toxic effect in polluted soil.

5.6 REFERENCES

- Altamirano, M., L. Garcia-Villada, M. Agrelo, L. Sánchez-Martin, L. Martin-Otero, A. Flores-Moya, M. Rico, V. López-Rodas and E. Costas. 2004. "A novel approach to improve specificity of algal biosensors using wild-type and resistant mutants : an application to detect TNT". *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, p. 1319-1323.
- American Society for Testing and Materials. 1999. "Standard guide for conducting terrestrial plant toxicity tests". E1963-98.
- Boopathy, R. 2000. "Bioremediation of explosives contaminated soil". *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 46, p. 29-36.
- Christensen, M. G., H. B. Teicher and J. C. Streibig. 2003. "Linking fluorescence induction curve and biomass in herbicide screening". *Pest. Manag. Sci.*, vol. 59, p. 1303-1310.
- Critchley, C. 1998. "Photoinhibition". In *Photosynthesis : a comprehensive treatise*. Editor, A. S. Raghavendra. New York : Cambridge University Press., pp. 246-272.
- Cruz, J. A., T. J. Avenson, A. Kanazawa, K. Takizawa, G. E. Edwards and D. M. Kramer. 2005. "Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection". *J. Exp. Bot.*, vol. 56, p. 395-406.
- Dewez, D., M. Marchand, P. Eullaffroy and R. Popovic. 2002. "Evaluation of the effects of diuron and its derivatives on *Lemna gibba* using a fluorescence toxicity index". *Environ. Toxicol.*, vol. 17, p. 493-501.
- Gong, P., B. M. Wilke and S. Fleischmann. 1999. "Soil-based phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher plants". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 36, p. 152-157.
- Horton, P. and A. Hague. 1988. "Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 932, p. 107-115.

- Juneau, P., A. El Berdey and R. Popovic. 2002. "PAM-fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 42, p. 155-164.
- Krishnan, G., G. L. Horst, S. Darnell and W. L. Powers. 2000. "Growth and development of smooth bromgrass and tall fescue in TNT-contaminated soil". *Environ. Pollut.*, vol. 107, p. 109-116.
- Lazár, D. 1999. « Chlorophyll *a* fluorescence induction ». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1412, p. 1-28.
- Lee, I., O. K. Kim, Y. Y. Chang, B. Bae, H. H. Kim and K. H. Baek. 2002. "Heavy metal concentrations and enzyme activities in soil from a contaminated Korean Shooting Range". *J. Biosc. Bioeng.*, vol. 94, p. 406-411.
- Mallick, N. and F. H. Mohn. 2003. "Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research : a case study with the green microalga *Scenedesmus*". *Ecotox. Environ. Saf.*, vol. 55, p. 64-69.
- Müller, P., X. P. Li and K. K. Niyogi. 2001. "Non-photochemical quenching : A response to excess light energy". *Plant Physiol.*, vol. 125, p. 1558-1566.
- Popovic, R., D. Dewez and P. Juneau. 2003. "Applications of chlorophyll fluorescence in ecotoxicology : heavy metals, herbicides and air pollutants". In *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*. Editors, J. R. DeEll and P. M. A. Toivonen. London : Kluwer Academic Publishers., pp 151-184.
- Robidoux, P. Y., G. Bardai, L. Paquet, G. Ampleman, S. Thiboutot, J. Hawari and G. I. Sunahara. 2003. "Phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in spiked artificial and natural forest soils". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 44, p. 198-209.
- Rohacek, K. and M. Bartak., 1999. "Technique of the modulated chlorophyll fluorescence : basic concepts, useful parameters, and some applications". *Photosynthetica*, vol. 37, p. 339-363.
- Rohacek, K. 2002. "Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships". *Photosynthetica*, vol. 40, p. 13-29.
- Schreiber, U., U. Schliwa and W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynth. Res.*, vol. 10, p. 51-62.

- Siciliano, S. D., R. Roy and C. W. Greer. 2000. "Reduction in denitrification activity in field soils exposed to long term contamination by 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) ". *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 32, p. 61-68.
- Strasser, B. J., H. Dau, H. Heinze and H. Senger. 1999. "Comparison of light induced and cell cycle dependent changes in the photosynthetic apparatus: A fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus*". *Photosynth. Res.*, vol. 60, p. 217-227.
- Talmage, S. S., D. M. Opresko, C. J. Maxwell, C. J. E. Welsh, F. M. Cretella, P. H. Reno and F. B. Daniel. 1999. "Nitroaromatic munition compounds : environmental effects and screening values". *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 161, p. 1-156.

Tableau 5.1 : The textural characteristics of the soil used for TNT treatment.

Soil characterization	
pH	7.89
Cations exchange capacity (meq/100ml)	20.3
Total organic carbon (%)	23
Sand (50 to 2000 μm) (%)	86.83
Total silt (2 to 50 μm) (%)	11.18
Clay (< 2 μm) (%)	1.99

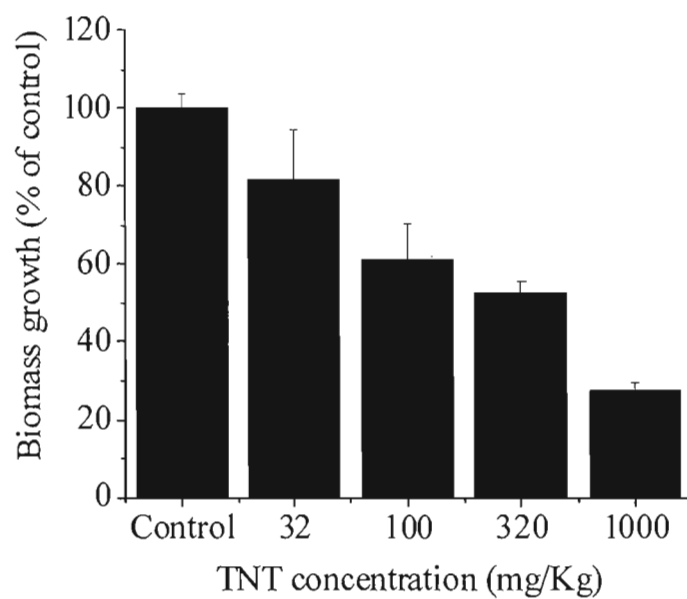


Figure 5.1 : Effect of TNT on *L. sativa* growth (fresh weight). Data represent the mean of four experiments ($P < 0.05$).

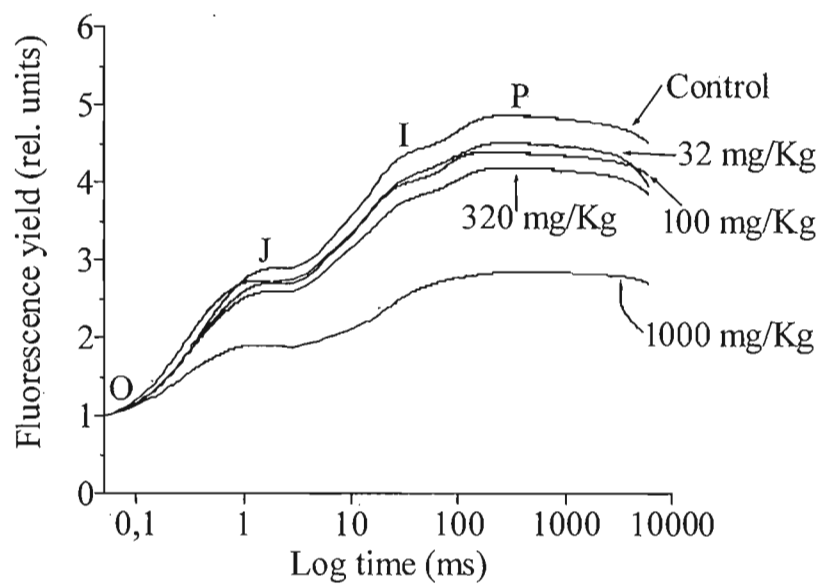


Figure 5.2. Chlorophyll *a* fluorescence transients of *L. sativa* affected by TNT treatments. Each fluorescence induction curve represents the average of at least six leaves measurements. Fluorescence yield was normalized by the F_0 level.

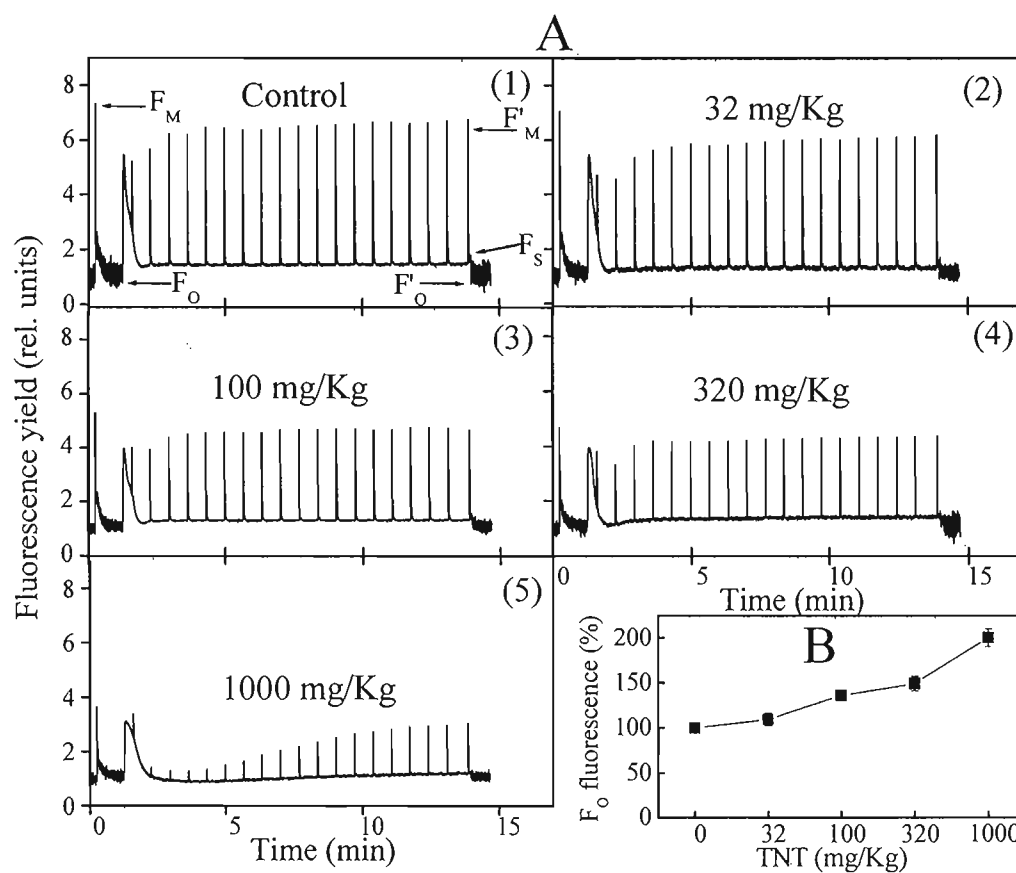


Figure 5.3. Chlorophyll *a* fluorescence analysis of *L. sativa* affected by TNT. A : PAM fluorescence measurement (1-5); B : the change of F_o fluorescence yield. Other details are the same as in figure 2.

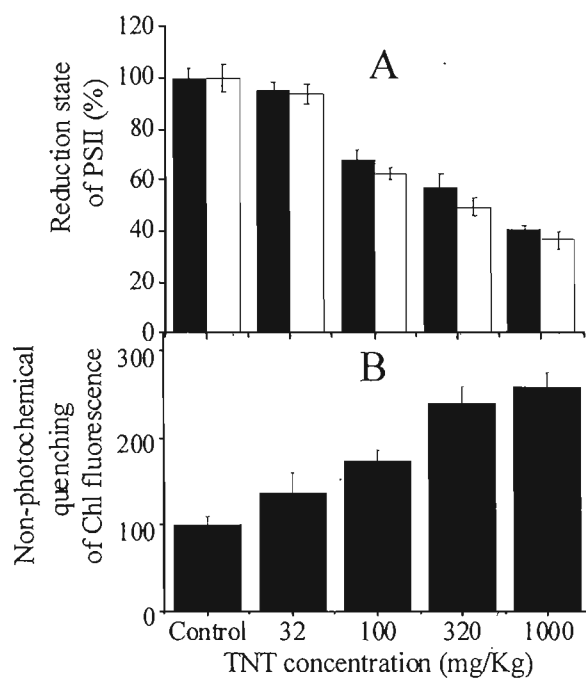


Figure 5.4. Effect of TNT on the PSII reduction state (A) and non-photochemical dissipation of absorbed light energy (B) when *L. sativa* has been treated by TNT. In A : full and open bars represent PSII reduction state when plants has been dark and light adapted, respectively.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif général de cette thèse portait sur l'étude de la fluorescence chlorophyllienne comme principal outil d'investigation des mécanismes de toxicité du chrome (hexavalent) et du trinitrotoluène (TNT) chez les algues et les plantes supérieures. Puisque la fluorescence chlorophyllienne donne des indications sur le fonctionnement de l'appareil photosynthétique, cette méthode peut être utilisée comme indicateur de l'état physiologique de l'organisme végétal. Notre travail contribue à l'avancement des connaissances en abordant trois problématiques concernant : 1) les mécanismes d'inhibition du transport d'électrons photosynthétiques par les effets toxiques du dichromate chez la plante aquatique *Lemna gibba* ; 2) les effets du dichromate sur les aspects fonctionnels du PSII chez les algues *Chlamydomonas reinhardtii* ayant une faible capacité de dissipation de l'énergie sous forme non photochimique; et 3) les effets du TNT sur le changement des paramètres photosynthétiques de la fluorescence chlorophyllienne qui peuvent être utilisés comme biomarqueurs de toxicité cellulaire chez les plantes.

Dans la première partie, nos résultats ont permis l'interprétation des mécanismes d'inhibition par le dichromate, du transport des électrons photosynthétiques grâce à l'analyse du changement des composantes protéiques du photosystème II et du rendement de la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne. Sur la base de l'analyse de la cinétique rapide de fluorescence, caractérisée par les transitions O-K-J-I-P, nous avons conclu que le dichromate inhibe le fonctionnement du système enzymatique de photolyse de l'eau et que, en conséquence, il diminue le transport des électrons en diminuant la réduction de Q_A . Nous avons découvert l'apparition de la transition K, résultant de l'inhibition du dégagement d'oxygène et de l'inactivation du centre réactionnel du photosystème II. D'autre part, nos résultats concernant les effets toxiques du dichromate sur les protéines du photosystème II indiquent que le site d'inhibition du dichromate se situe au niveau de la protéine D1 et de la protéine de 33 kDa (diminution de 50 et 29 % respectivement) du complexe de photolyse de l'eau. Dans les mêmes conditions, les polypeptides associés au LHCII ne sont pas affectés par la toxicité du dichromate. Cette altération de la protéine D1 et du complexe de photolyse de l'eau a provoqué l'inactivation des centres réactionnels du photosystème II et, par

conséquent, une diminution de l'efficacité des réactions photochimiques primaires du photosystème II. Dans ces conditions, une grande partie de l'énergie absorbée en excès par les antennes collectrices de lumière du photosystème II est dissipée sous forme non photochimique. Dans cette étude, nous avons aussi montré que le dichromate, en tant qu'inhibiteur du transport des électrons photosynthétiques, induit un stress oxydatif grâce à la formation excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Cette formation des ERO, de même que la proportion des centres réactionnels du PSII en état fonctionnel, ont été fortement corrélés avec la diminution de la teneur des polypeptides D1. Par conséquent, nos résultats confirment que les altérations fonctionnelles du photosystème II, induites par le dichromate, sont reliées au changement structural au sein des complexes du photosystème II. En conclusion, nous avons établi que les effets toxiques du dichromate sur *L. gibba*, causant l'inhibition de transport d'électrons du photosystème II, sont associés avec la formation des espèces réactives de l'oxygène, et aux dommages fonctionnels et structuraux au sein des complexes du photosystème II. Dans cette partie de notre projet, nous avons montré que les effets inhibiteurs des réactions photochimiques du photosystème II par le dichromate sont associés à l'altération de la protéine D1, du système de photolyse de l'eau et à la formation des espèces réactives de l'oxygène. Ces effets inhibiteurs du dichromate, sur le fonctionnement du photosystème II, semblent être similaires à ceux provoqués par la formation de ERO lors de l'exposition des algues à une intensité de lumière élevée induisant la photoinhibition.

Dans la deuxième partie de notre projet, nous avons donc analysé les effets toxiques du dichromate sur les propriétés fonctionnelles du PSII chez deux algues mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii*, ayant un cycle des xanthophylles non fonctionnel : le premier mutant *npq1*, déficient en zéaxanthine, et le deuxième mutant *npq2*, déficient en violaxanthine mais accumulant la zéaxanthine. Dans notre étude, nous avons confirmé que les mutants *npq1* et *npq2* possèdent une faible capacité de dissiper l'excès d'énergie lumineuse sous forme non photochimique. En utilisant ces mutants, nous avons étudié les effets toxiques du dichromate sur l'activité du PSII dans des conditions variables d'intensités lumineuses. Nous avons quantifié le changement, induit par le dichromate, du rendement photochimique opérationnel du PSII et la dissipation non photochimique de l'énergie lumineuse. Nous avons

aussi estimé la proportion des centres réactionnels du PSII participant au transport d'électrons par le *quenching* photochimique de la fluorescence (qP). Lorsque les algues *C. reinhardtii* ont été exposées au dichromate, le transport d'électrons du PSII a été différent chez les mutants *npq1* et *npq2* si on les compare avec l'algue sauvage (non mutant). Sous intensité lumineuse élevée, le mutant *npq1* (déficient en zéaxanthine), exposé au dichromate, montre une faible capacité de maintenir un transport d'électrons au niveau du PSII. En absence de dichromate, le transport d'électrons était similaire chez le mutant *npq2* (accumulant la zéaxanthine) et chez l'algue sauvage, tout en montrant une résistance à la photoinhibition si on les compare au mutant *npq1*. Cependant, quand ces algues sont exposées à 12.5 μM de dichromate, l'activité photochimique du PSII (indiquée par qP) chez le mutant *npq2* est complètement inhibée sous une intensité lumineuse moyenne (à savoir 320 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), par comparaison à l'algue non mutante (600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Cet effet inhibiteur du dichromate était de plus, proportionnel à la concentration de dichromate utilisée. Nous avons conclu que le dichromate augmente la sensibilité des algues aux effets inhibiteurs de la lumière puisque la photoinhibition a été induite à faible intensité de lumière. De la même façon, quand les mutants *npq1* et *npq2* sont exposés au dichromate (12.5 μM), on observe une inhibition complète du rendement photochimique, Y(II), du PSII à 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, alors que l'algue de type sauvage est fonctionnelle jusqu'à 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Grâce à ces données, nous avons conclu que le dichromate accélère le processus de photoinhibition chez les algues déficientes en xanthophylles.

L'altération de l'activité photochimique du photosystème II par l'effet du dichromate a également induit une altération additionnelle au niveau du mécanisme de dissipation d'énergie sous forme non photochimique. Nos résultats indiquent que la dissipation d'énergie sous forme non photochimique Y(NPQ), impliquant des processus régulateurs, augmente lorsque les algues sont exposées à une intensité lumineuse croissante. Cependant, lorsque ces algues sont exposées au dichromate, cette dissipation d'énergie sous forme non photochimique, Y(NPQ) est diminuée. Ceci montre que le dichromate induit une altération des processus régulateurs concernant les xanthophylles, et d'autres caroténoïdes, qui participent à la dissipation de l'excès d'énergie absorbée sous forme non photochimique. Par cet effet, le dichromate favorise la photoinhibition en inhibant les réactions photochimiques

du PSII dans des conditions d'intensité lumineuse relativement faible. Lorsque les algues mutantes *npq1* et *npq2* sont exposées à une intensité lumineuse croissante en présence de dichromate, la dissipation non photochimique de l'énergie via les mécanismes non régulateurs, $Y(NO)$, devient majoritaire, atteignant la valeur de 80 % de l'énergie totale absorbée par les antennes chlorophylliennes. Par conséquent, les algues mutantes *npq1* et *npq2*, ayant une faible dissipation non photochimique d'énergie via les mécanismes régulateurs, $Y(NPQ)$, montrent une sensibilité plus importante aux effets toxiques de dichromate comparativement aux algues de type sauvage. Compte tenu de la réponse de ces mutants aux effets du dichromate et de la lumière, nous avons conclu que la présence du cycle des xanthophylles fonctionnel est nécessaire pour minimiser la photoinhibition du photosystème II induite par la toxicité du dichromate.

Dans la troisième partie de notre projet, nous avons utilisé la méthode de PAM et la cinétique de fluorescence rapide pour évaluer la toxicité du TNT sur l'activité photosynthétique chez la plante supérieure *Lactuca sativa*. Dans ce projet de recherche, les résultats obtenus ont permis la détermination de la sensibilité des paramètres photosynthétiques de fluorescence lorsque la plante de laitue a été exposée au TNT. Nos résultats montrent que l'effet de ce dernier sur la photosynthèse peut être détecté à l'aide de la fluorométrie modulée et de la cinétique rapide de fluorescence. Sur la base de la fluorescence PEA, le TNT induit, à forte concentration, un changement important de la cinétique de fluorescence, exprimé par une diminution du niveau maximal de fluorescence à la transition P. Ceci indique que le TNT induit une inhibition de la réduction de QA, et donc du transport d'électrons entre les PSII et PSI. Grâce à la cinétique modulée, nous avons trouvé que l'effet de TNT provoque une diminution du niveau maximal de fluorescence à l'état adapté à l'obscurité, FM, et également à l'état adapté à la lumière, F'M. Ces modifications de la cinétique de fluorescence PAM indiquent une altération des processus photosynthétiques. Ainsi, le TNT entraîne-t-il une diminution de la proportion des centres réactionnels du PSII participant au transport d'électrons (indiqués par les paramètres FM-Fo et F'M-Fs) et une augmentation de la dissipation de l'énergie par la voie non photochimique (qN). De plus, nous avons observé un ralentissement du transport d'électrons entre le PSII et le PSI. De cette étude, nous concluons que la valeur du « quenching » non photochimique (qN) et celle de

l'état de réduction des centres réactionnels du PSII sont les indicateurs les plus sensibles de la modification de l'état physiologique induit par les effets toxiques du TNT chez *L. sativa*. Par conséquent, nous suggérons que ces paramètres photosynthétiques de fluorescence peuvent fournir de précieuses informations pour utiliser la fluorescence chlorophyllienne de la laitue en vue d'évaluer les effets toxiques de TNT dans les sols pollués.

En conclusion dans notre étude, trois aspects particuliers ont été suffisamment novateurs pour mériter d'être mis en relief. Nous avons démontré que l'apparition de la transition K sur la cinétique de la fluorescence chlorophyllienne est la conséquence de l'altération de la protéine 33 kDa du système de photolyse de l'eau du PSII par le dichromate. Cette transition K a été obtenue lorsque les plantes ont été exposées aux effets toxiques du dichromate. Un tel effet n'a pas été observé chez les plantes exposées au TNT, ce qui prouve que les mécanismes d'inhibition de l'activité photochimique du PSII par le TNT et le dichromate sont différents. La question de la dégradation de la protéine D1 est une autre découverte majeure dans cette thèse. Nous avons attribué l'inhibition des réactions photochimiques du PSII par le dichromate à la perte de la protéine D1 du centre réactionnel du PSII. Cependant, puisque les protéines D1 et D2 sont quasiment enchevêtrées l'une dans l'autre dans le PSII, il est très possible que la disparition de la protéine D1 entraîne la disparition de la protéine D2 ou vice versa. Ce processus serait peut être suivi de l'altération du centre réactionnel du PSII, une déstabilisation qui expliquerait la perte de la protéine 33 kDa. Il est souhaitable dans les travaux futurs de déceler si la protéine D2 subit une altération lorsque les plantes sont exposées aux effets toxiques du dichromate. Une autre découverte importante dans cette thèse est la démonstration de l'absence de la dissipation non photochimique de l'énergie (mesurée par le quenching non photochimique $[NPQ = (F_M - F_M')/F_M']$ de la fluorescence) chez le mutant *npq2* de *Chlamydomonas reinhardtii* quand il est exposé à une faible intensité lumineuse ($<100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ce mutant accumule la zéaxanthine et possède un faible rendement de la fluorescence maximale de la chlorophylle (F_M) quand il est adapté à l'obscurité. Une explication possible de l'absence du NPQ est la présence d'un quenching de F_M . Un processus similaire a été démontré chez le mutant *npq2* de *Arabidopsis thaliana* qui accumule la zéaxanthine (Dall'Osto et al., 2005). Ce quenching du F_M ne dépend pas du gradient des protons et a été attribué à la liaison de la zéaxanthine à

la protéine CP26 des antennes collectrices de lumière du PSII. Cette dernière subit un changement de conformation qui induit un faible rendement de la fluorescence F_M . On peut supposer que la présence d'un grand pool de zéaxanthine chez le mutant *npq2* induit un quenching du F_M et par conséquent l'absence de la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur. Cette question méritera d'être investiguée en profondeur pendant les futurs projets de recherche.

Nous avons également conclu que parmi les paramètres de fluorescence utilisés comme biomarqueurs de l'activité photosynthétique, les plus sensibles aux effets toxiques du dichromate et du TNT sont : la taille des antennes collectrices de lumière du centre réactionnel du PSII (ABS/RC), la dissipation de l'énergie sous forme non photochimique (mesurée par NPQ, q_N et DI_0/RC) et la proportion des centres réactionnels en état fonctionnel du PSII (RC/CS). Par conséquent, on a pu démontrer que ces paramètres de fluorescence représentaient des biomarqueurs caractérisés par une grande sensibilité dans l'évaluation de la toxicité cellulaire de xénobiotiques qui affectent les réactions photochimiques du PSII.

AUTRES CONTRIBUTIONS

Perreault F., Ait Ali N., Saison C., Juneau P., Popovic R. 2007. "Alteration of energy dissipation by dichromate in xanthophyll deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*". Proceedings of 14th International Congress of Photosynthesis, Glasgow.

Dewez D., Ait Ali N., Perreault F., Popovic R. 2006. "Rapid chlorophyll *a* fluorescence transient of *Lemna gibba* leaf as an indication of light and hydroxylamine effect on photosystem II activity". Photochemical and Photobiological Sciences, vol. 5, p. 532-538.

Ater M., Ait Ali N., Kasmi H. 2006. Tolerance and accumulation of copper and chromium in two duckweed species : *Lemna minor* and *Lemna gibba*. Revue des Sciences de l'eau, vol. 19, p. 57-67.

Ait Ali N., Ater M., Sunahara G.I., Robidoux P. Y. 2004. Phytotoxicity and bioaccumulation of copper and chromium using barley (*Hordeum vulgare* L.) in spiked artificial and natural forest soils. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 57, p. 363-374.

Ait Ali N., Bernal M.P., Ater M. 2004. Tolerance and bioaccumulation of cadmium by *Phragmites australis* grown in the presence of elevated concentrations of cadmium, copper and zinc. Aquatic Botany, vol. 80, p. 163-176.

Ait Ali N., Bernal M.P., Ater M. 2002. Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. Plant and Soil, vol. 239, p. 103-111.

RÉFÉRENCES

- Ait Ali, N., D. Dewez, O. Didur and R. Popovic. 2006. "Inhibition of photosystem II photochemistry by chromium is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex". *Photosynth. Res.*, vol. 89, p. 81-87.
- Allen, J. F. 2002. "Photosynthesis of ATP, electrons, protons pumps, rotors, and poise". *Cell*, vol. 110, p. 273-276.
- Allen, J. F. and J. Forsberg. 2001. "Molecular recognition in thylakoid structure and function". *Trends Plant Sci.*, vol. 6, p. 317-320.
- Appenroth, K.J., J. Stöckel, A. Srivastava and R. J. Strasser. 2001. "Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurements". *Environ. Pollut.*, vol. 115, p. 49-64.
- Asada, K. 1994. "Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues". In *Causes of photooxydative stress and amelioration of defence systems in plants*. Editors, C. H. Foyer and P. M. Mullineaux. Boca Raton : CRC Press, pp. 77-104.
- Babu, T. S., T. A. Akhtar, M. A. Lampi, S. Tripuranthakam, D. G. Dixon and B. M. Greenberg. 2003. "Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: implication of reactive oxygen species as common signals". *Plant Cell Physiol.*, vol. 44, p. 1320-1329.
- Baker, N. R. and E. Rosenqvist. 2004. "Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities". *J. Exp. Bot.*, vol. 55, p. 1607-1621.
- Barber, J. 1983. "Membrane conformational changes due to phosphorylation and the control of energy transfer in photosynthesis". *Photobiochem. Photobiophys.*, vol. 5, p. 181-190.
- Barber, J., J. Nield, E. P. Morris, D. Zheleva and B. Hankamer. 1997. "The structure function and dynamics of photosystem II". *Physiol. Plant.*, vol. 100, p. 817-827.
- Barber, J. and W. Kuhlbrandt. 1999. "Photosystem II". *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 9, p. 469-475.
- Barber, J. 2004. "Water, water everywhere, and its remarkable chemistry". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1655, p. 123-132.

- Baron, M., J. Rahoutei, J. J. Lazaro and I. Garcia-Luque. 1995. "PSII response to biotic and abiotic stress". In *Photosynthesis : From Light to Biosphere*. Editor, P. Mathis. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, vol. IV, pp. 897-900.
- Barra, M., M. Haumann and H. Dau. 2005. "Specific loss of the extrinsic 18 kDa protein from photosystem II upon heating to 47 degrees C causes inactivation of oxygen evolution likely due to Ca release from the Mn-complex". *Photosynth. Res.*, vol. 84, p. 231-237.
- Bassi, R., D. Sandona and R. Croce. 1997. "Novel aspect of chlorophyll a/b binding proteins". *Physiol. Plant.*, vol. 100, p. 769-779.
- Bellaïfiore, S., F. Barneche, G. Peltieret and J. D. Rochaix. 2005. "State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7". *Nature*, vol. 433, p. 892-895.
- Bernal, M., M. Roncel, J. M. Ortega, R. Picore and I. Yruela. 2004. "Copper effect on cytochrome b559 of photosystem II under photoinhibitory conditions". *Physiol. Plant.*, vol. 120, p. 686-694.
- Bernier, M. and R. Carpentier. 1995. "The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II". *FEBS Lett.*, vol. 360, p. 251-254.
- Björkman, O. and B. Demmig. 1987. "Energy-dependent quenching of dark-level chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plant of diverse origins". *Planta*, vol. 170, p. 489-504.
- Blankenship, R. E. 2002. "Molecular mechanisms of Photosynthesis". Oxford : Blackwell Science Ltd., pp. 328.
- Buchanan, B. B., W. Gruissem and R. L. Jones. 2000. *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville: Maryland, 1367 p.
- Burda, K., J. Kruk, G. H. Schmid and K. Strzalka. 2003. "Inhibition of oxygen evolution in photosystem II by Cu(II) ions is associated with oxidation of cytochrome b559". *J. Biochem.*, vol. 371, p. 597-601.
- Butler, W. L. and M. Kitajima. 1975. "A tripartite model for chloroplast fluorescence". *Proceedings, 3rd International Congress on Photosynthesis*. Rehovot, p. 13-24.
- Chapelka, A. H. and L. J. Samuelson. 1998. "Ambient ozone effects on forest trees of the eastern United States, a review". *New Phytol.*, vol. 139, p. 91-108.

- Clark, B. and R. Boopathy. 2007. "Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana". *J. Hazard Mater*, vol. 143, p. 643-648.
- Dall'Osto, L., S. Caffarri et R. Bassi. 2005. "A mechanism of nonphotochemical energy dissipation independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26". *Plant Cell*, vol. 17, p. 1217-1232.
- Dat, J., E. Vandenabeele, M. Vranova, V. Montagu, D. Inzé and F. Van Breusegem. 2000. "Dual action of the active oxygen species during plant stress response". *Cell Mol. Life Sci.*, vol. 57, p. 779-795.
- De Filippis, L. F. and C. K. Pallaghy. 1994. "Heavy metals: sources and biological effects". In *Algae and Water Pollution : Advances in Limnology*. Editors, L.C. Rai, J. P. Caur, and C. J. Soeder. Schweizerbart : Stuttgart, vol. 42, pp. 32-77.
- De Las Rivas, J. D., M. Balsera and J. Barber. 2004. "Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins". *Trends Plant Sci.*, vol. 9, p. 18-25.
- Dekker, J. P. and E. J. Boekema. 2005. "Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1706, p. 12-39.
- Dekker, J. P. and R. Van Grondelle. 2000. "Primary charge separation in photosysteme II". *Photosynth. Res.*, vol. 63, p. 195-208.
- Dewez, D., M. Marchand, P. Eullaffroy and R. Popovic. 2002. "Evaluation of diuron derivatives effects on *Lemna gibba* by using fluorescence toxicity index". *Environ. Toxicol.*, vol. 17, p. 493-501.
- Drazkiewicz, M., E. Skorzynska and Z. Krupa. 2004. "Copper induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*". *BioMetals*, vol. 17, p. 379-387.
- Faller, P., R. J. Debus, K. Brettel, M. Sugiura, A. W. Rutherford and A. Boussac. 2001. "Rapid formation of the stable tyrosyl radical in photosystem II". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 98, p. 14368-14373.
- Force, L., C. Critchley and J. J. S. Van Rensen. 2003. "New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants". *Photosynth. Res.*, vol. 78, p. 17-33.
- Foyer, C. H. and G. Noctor. 2000. "Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling". *New Phytol.*, vol. 146, p. 359-388.
- Franco, F., S. Alessandrelli, J. Masojidek, A. Margonelli and M. T. Giardi. 1999. "Modulation of D1 protein turnover under cadmium and heat stresses monitored by [35S]methionine incorporation". *Plant Sci.*, vol. 144, p. 53-61.

- Fufezan, C., A. W. Rutherford and A. Krieger-Liszkay. 2002. "Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II". *FEBS Lett.*, vol., 532, p. 407-410.
- Garcia-Pintado, J., M. Martinez-Mena, G. G. Barbera, J. Albaladejo and V. M. Castillo. 2007. "Anthropogenic nutrient sources and loads from Mediterranean catchments into a coastal lagoon : Mar menor, Spain". *Sci. Total Environ.*, vol. 373, p. 220-239.
- Genty, B., J. M. Briantais and N. R. Baker. 1989. "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 990, p. 87-92.
- Geoffroy, L., D. Dewez, G. Vernet and R. Popovic. 2003. "Oxyfluorfen toxic effect on *S. obliquus* evaluated by different photosynthetic and enzymatic biomarkers". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 45, p. 445-452.
- Gérin, M., P. Gosselin, C. Viau, P. Quénel and E. Dewailly. 2003. "Environnement et santé publique". Québec: Edisem Inc., pp. 641-779.
- Giardi, M. T., J. Masojidek and D. Godde. 1997. "Effects of abiotic stresses on the turnover of D1 reaction centre II protein". *Physiol. Plant.*, vol. 101, p. 635-642.
- Gillet, S., P. Decottignies, S. Chardonnet and P. Le Marechal. 2006. "Cadmium response and redoxin targets in *Chlamydomonas reinhardtii* : a proteomic approach". *Photosynth. Res.*, vol. 89, p. 201-211.
- Golding, A. J. and G. N. Johnson. 2003. "Down regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought". *Planta*, vol. 218, p. 107-114.
- Gonzales-Barreiro, O., C. Rioboo, A. Cid and C. Herrero. 2004. "Atrazine induced clorosis in *Synechococcus elongatus* cells". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 46, p. 301-307.
- Govindjee and W. T. Coleman. 1990. "How plants make oxygen". *Sci. American*, vol., 262, p. 50-58.
- Govindjee. 1995. "Sixty-three years since Kautsky : chlorophyll *a* fluorescence". *Aust. J. Plant. Physiol.*, vol. 22, p. 131-160.
- Govindjee, J. Ames and R. S. Knox. 1996. "Photosynthetic unit: Antenna and reaction centers". *Photosynth. Res.*, vol. 48, p. 1-319.
- Govindjee and M. Seufferheld. 2002. "Non-photochemical quenching of chlorophyll *a* fluorescence : early history and characterization of two xanthophylls-cycle mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Funct. Plant Biol.*, vol. 29, p. 1141-1155.

- Govindjee and P. Spilotro. 2002. "An *Arabidopsis thaliana* mutant, altered in the γ -subunit of ATP synthase, has a different pattern of intensity-dependent changes in non-photochemical quenching and kinetics of P-to-S fluorescence decay". *Funct. Plant Biol.*, vol. 29, p. 425-434.
- Green, B. R. and D. G. Durnford. 1996. "The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 47, p. 685-714.
- Guissé, B., A. Srivastava and R. J. Strasser. 1995. "The polyphasic rise of the chlorophyll *a* fluorescence (O-K-J-I-P) in heat-stressed leaves". *Arch. Sci. Genève*, vol. 48, p. 147-160.
- Guo, W., M. He, Z. Yang, C. Lin, X. Ouan and H. Wang. 2007. "Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China". *Chemosphere*, vol. 68, p. 93-104.
- Guseinova, I. M., S. Y. Suleimanov and J. A. Aliyev. 2005. "The effect of norflurazon on protein composition and chlorophyll organization in pigment-protein complex of photosystem II". *Photosynth. Res.*, vol. 84, p. 71-76.
- Hall, D. O. and K. K. Rao. 1994. "*Photosynthesis*", New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Hansen, U. P., H. Dau, B. Bruning, T. Fritsch and C. Moldaenke. 1991. "Linear analysis applied to the comparative study of the I-D-P phase of chlorophyll fluorescence as induced by actinic PSII light, PSI light and changes in CO₂ concentration". *Photosynth. Res.*, vol. 28, p. 119-130.
- Haumann, M. and W. Junge. 1999. "Evidence for impaired hydrogen-bonding of tyrosine YZ in calcium-depleted photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1411, p. 121-133.
- Havaux, M., R. J. Strasser and H. Greppin. 1991. "A theoretical and experimental analysis of the Q_P and Q_N coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events". *Photosynth. Res.*, vol. 27, p. 41-55.
- Heller, R., R. Esnault and C. Lance. 1998. "Physiologie végétale. 1 Nutrition". Paris : Dunod, pp. 323.
- Henmi, T., M. Miyao and Y. Yamamoto. 2004. "Release and reactive-oxygen-mediated damage of the oxygen evolving complex subunits of PSII during photoinhibition". *Plant Cell Physiol.*, vol. 45, p. 243-250.
- Heredia, P. and J. De Las Rivas. 2003. "Calcium dependent conformational change and thermal stability of the isolated PsbO protein detected by FTIR spectroscopy". *Biochemistry*, vol. 42, p. 11831-11838.

- Heung, W., M. J. Yun, D. P. Chang, P. G. Green and C. Halm. 2007. "Emissions of chromium (VI) from arc welding". *J. Air Waste Manag. Assoc.*, vol. 57, p. 252-260.
- Hong, S. S. and D. Q. Xu. 1999. "Light-induced increase in initial chlorophyll fluorescence F_0 level and the reversible inactivation of PSII reaction centers in soybean leaves". *Photosynth. Res.*, vol. 61, p. 269-280.
- Horton, P., A. V. Ruban and R. G. Walters. 1996. "Regulation of light harvesting in green plants". *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 47, p. 655-684.
- Horton, P., M. Wentworth and A. Ruban. 2005. "Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching". *FEBS Lett.*, vol. 579, p. 4201-4206.
- Hsu, B. D. 1993. "Evidence for the contribution of the S-state transitions of oxygen evolution to the initial phase of fluorescence induction". *Photosynth. Res.*, vol. 36, p. 81-88.
- Ikeda, Y., S. Ohki, K. Koizumi, A. Tanaka, H. Watanabe, H. Kohno, J. J. Van Rensen, P. Boger and K. Wakabayashi. 2003. "Binding site of novel 2-benzylamino-4-methyl-6-trifluoromethyl-1,3,5-triazine herbicides in the D1 protein of photosystem II". *Photosynth. Res.*, vol. 77, p. 35-43.
- Iwata, S. and J. Barber. 2004. "Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen evolving centre". *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 14, p. 447-453.
- Jegerschold, C., J. B. Arellano, W. B. Schroder, P. J. M. Van Kan, M. Baron and S. Styring. 1995. "Cu(II) inhibition of the electron transfer through photosystem II studied by EPR spectroscopy". *Biochemistry*, vol. 34, p. 12747-12754.
- Jensen, P. E., R. Bassi, E. J. Boekema, J. P. Dekker, S. Jansson, D. Leister, C. Robinson and H. V. Scheller. 2007. "Structure, function and regulation of plant photosystem I". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1767, p. 335-352.
- Johnson, J., L. Schewel and T. E. Graedel. 2006. "The contemporary anthropogenic chromium cycle". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, p. 7060-7069.
- Joliot, P., G. Barbieri and R. Chabaud. 1969. "Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II". *Photochem. Photobiol.*, vol. 10, p. 309-329.
- Ju, X. T., C. L. Kou, P. Christie, Z. X. Dou and F. S. Zhang. 2007. "Changes in the soil environment from excessive application of fertilizers and manures to two contrasting intensive cropping systems on the North China Plain". *Environ. Pollut.*, vol. 145, p. 497-506.

- Juneau, P. and R. Popovic. 2000. "Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: importance and future application". *Ecotoxicology*, vol. 8, p. 449-455.
- Juneau, P., D. Dewez, Matsui S., S. G. Kim and R. Popovic. 2001. "Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metachlor by PAM-fluorometry". *Chemosphere*, vol. 45, 589-598.
- Jupin, H. and A. Lamant. 1999. "La photosynthèse". Paris: Dunod, pp. 268.
- Kanervo, E., M. Suorsa and E. M. Aro. 2005. "Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane". *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 4, p. 1072-1080.
- Karukstis, K. K. 1991. "Chlorophyll fluorescence as a physiological probe of the photosynthetic apparatus". In *Chlorophylls*. Editor, H. Scheer. Boston/London: CRC Press, Boca Raton, p. 770-797.
- Kautsky, H. and A. Hirsch. 1931. "Neue Versuche zur kohlenensäureassimilation". *Naturwissensch*, vol. 19, p. 964.
- Kingston-Smith, A. H. and C. H. Foyer. 2000. "Bundle sheat proteins are more sensitive to oxidative damage than those of the mesophyll in maize leaves exposed to paraquat or low temperatures". *J. Exp. Bot.*, vol. 51, p. 123-130.
- Kirilovsky, D., A. W. Rutherford and A. L. Etienne. 1994. "Influence of DCMU and ferricyanide on photodamage in photosystem II". *Biochemistry*. vol. 33, p. 3087-3095.
- Kok, B., B. Forbush and M. Mc Gloin. 1970. "Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. I. A linear four steps mechanism". *Photochem. Photobiol.*, vol. 11, p. 457-475.
- Kramer, D. M., G. Johnson, O. Kiirats and G. E. Edwards. 2004. "New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes". *Photosynth. Res.*, vol. 79, p. 209-218.
- Krause, G. and P. Jahns. 2003. "Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science". In *Advances in Photosynthesis and respiration: Light-harvesting antennas in Photosynthesis*. Editors, B. V. Green and W. W. Parson. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, pp. 373-399.
- Krause, G. H. and P. Jahns. 2004. "Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function". In *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Editors, G. C. Papageorgious and Govindjee. Dordrecht: Springer, pp. 463-495.

- Krause, G.H. and E. Weis. 1991. "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basis". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 42, p. 313-349.
- Krieger-Liszkay, A. and A. W. Rutherford. 1998. "Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinone acceptor in photosystem II: relevance to photodamage and phytotoxicity". *Biochemistry*, vol. 37, p. 17339-17344.
- Krishnan, G., G. L. Horst, S. Darnell and W. L. Powers. 2000. "Growth and development of smooth bromgrass and tall fescue in TNT-contaminated soil". *Environ. Pollut.*, vol. 107, p. 109-116.
- Krüger, G. H. J., M. Tsimilli-Michael and R. J. Strasser. 1997. "Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in *Camellia* leaves". *Physiol. Plant.*, vol. 101, p. 265-277.
- Krúpa, Z., G. Oquist and N. Huner. 1993. "The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris*- a fluorescence analysis". *Physiol. Plant.*, vol. 88, p. 626-630.
- Kukarskikh, G. L., E. E. Graevskaia, T. E. Krendeleva, K. N. Timofeev and A. B. Rubin. 2003. "Effect of methylmercury on primary photosynthesis processes in green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*". *Biofizika*, vol. 48, p. 853-859.
- Küpper, H., F. Küpper and M. Spiller. 1996. "Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophyll using the example of water plants". *J. Exp. Bot.*, vol. 47, p. 259-266.
- Küpper, H., F. Küpper and M. Spiller. 1998. "In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants". *Photosynth. Res.*, vol. 58, p. 123-133.
- Küpper, H., I. Setlik, M. Spiller, F. C. Küpper and O. Prasil. 2002. "Heavy metals induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation". *J. Phycol.*, vol. 38, p. 429-441.
- Lazár, D. 1999. "Chlorophyll *a* fluorescence induction". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1412, p. 1-28.
- Lazár, D. 2006. "The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light". *Funct. Plant Biol.*, vol. 33, p. 9-30.
- Lee, C. L., K. V. Lakshmi and G. W. Brudvig. 2007. "Probing the functional role of Ca^{2+} in the oxygen evolving complex of photosystem II by metal ion inhibition". *Biochemistry*, vol. 46, p. 3211-3223.
- Lewis, T. A., D. A. Newcombe and R. L. Crawford. 2004. "Bioremediation of soils contaminated with explosives". *J. Environ. Manage.*, vol. 70, p. 291-307.

- Litchenthaler, H. K. 1998. "The stress concept in plant: an introduction". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 851, p. 187-198.
- Lu, C. M., C. W. Chau and J. H. Zhang. 2000. "Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium *S. platensis* assessment by chlorophyll fluorescence analysis". *Chemosphere*, vol. 41, p. 191-196.
- Lupinková, L. and J. Komenda. 2004. "Oxidative modifications of the photosystem II D1 protein by reactive oxygen species: from isolated protein to Cyanobacterial cells". *Photochem. Photobiol.*, vol. 79, p. 152-162.
- Malkin, R. and K. Niyogi. 2001. "Photosynthesis". In *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville: Maryland, pp. 568-628.
- Mallick, N. and F. H. Mohn. 2003. "Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 55, p. 64-69.
- Martin, W., R. Scheibe and C. Schnarrenberger. 2000. "The Calvin cycle and its regulation". In *Photosynthesis: physiology and metabolism*. Editors, R. C. Leegood, T. D. Sharkey and S. Von Caemmerer. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, p. 9-51.
- McKersie, B. D. and Y. Y. Leschem. 1994. "Oxidative stress". In *Stress and stress coping in cultivated plants*. Editors, B. D. McKersie and Y. Y. Leshem. Dordrecht, Pays-Bas : Kluwer Academic Publishers, p. 15-54.
- Minagawa, J. and Y. Takahashi. 2004. "Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins". *Photosynth. Res.*, vol. 82, p. 241-263.
- Mittler, R. 2002. "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance". *Trends Plant Sci.*, vol. 7, p. 405-410.
- Miyao, M. and N. Murata. 1984. "Role of the 33-kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolving system and its replacement by chloride ions". *FEBS Lett.*, vol. 170, p. 350-354.
- Mohanty, N., I. Vass and S. Demeter. 1989. "Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor (Q_B)". *Plant Physiol.*, vol. 90, p. 175-179.
- Morosinotto, T., S. Caffari, L. Dall'Osto and R. Bassi. 2003. "Mechanistic aspect of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids". *Physiol. Plant.*, vol. 119, p. 347-354.
- Müller, P., X. P. Li and K. K. Niyogi. 2000. "Non-photochemical quenching. A response to excess light energy". *Plant Physiol.*, vol. 125, p. 1558-1566.

- Murthy, S. D., N. Mohanty and P. Mohanty. 1995. "Prolonged incubation with low concentrations of mercury alters energy transfer and chlorophyll (Chl) *a* protein complexes in *Synechococcus* 6301: changes in Chl *a* absorption and emission characteristics and loss of the F695 emission band". *Biometals*, vol. 8, p. 237-242.
- Mustárdy, L. and G. Garab. 2003. "Granum revisited. A three dimensional model where things fall into place". *Trends Plant Sci.*, vol. 8, p. 117-122.
- Mysliwa-Kurdziel, B. and K. Strzalka. 2005. "Influence of Cd(II), Cr(VI) and Fe(III) on early steps of deetiolation process in wheat: fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide". *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 106, p. 199-207.
- Naessens, M., Leclerc, J. C. and C. Tran-Minh. 2000. "Fiber optic biosensor using *Chlorella vulgaris* for determination of toxic compounds". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 46, p. 181-5.
- Naidoo G. and D. Chirkoot. 2004. "The effect of coal dust on photosynthetic performance of the mangrove *Avicennia marina* in Richards Bay, South Africa". *Environ. Pollut.*, vol. 127, p. 359-366.
- Nakajima, Y., S. Yoshida and T. A. Ono. 1996. "Differential of urea/triazine-type and phenol-type photosystem II inhibitors on inactivation of the electron transport and degradation of D1 protein during photoinhibition". *Plant Cell Physiol.*, vol. 37, p. 673-680.
- Nelson, N. and A. Ben-Shem. 2004. "The complex architecture of oxygenic photosynthesis". *Mol. Cell Biol.* vol. 5, p. 1-12.
- Neubauer, C. and U. Schreiber. 1987. "The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side". *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 42, p. 1246-1254.
- Nilsson, A., D. Stys, T. Drakenberg, M. D. Spangfort, S. Forsen and J. F. Allen. 1997. "Phosphorylation controls the three-dimensional structure of plant light-harvesting complex II". *J. Biol. Chem.*, vol. 272, p. 18350-18357.
- Nishiyama, Y., S. I. Allakhverdiev and N. Murata. 2006. "New paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1757, p. 742-749.
- Niyogi, K. K., O. Bjorkman and A. R. Grossman. 1998. "*Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophylls cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion". *Plant Cell*, vol. 10, p. 1121-1134.

- Niyogi, K. K., O. Bjorkman and A. R. Grossman. 1997. "*Chlamydomonas* xanthophylls cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching". *The Plant Cell*, vol. 8, p. 1369-1380.
- Niyogi, K. K. 1999. "Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 50, p. 333-359.
- Ort, D. R. 1986. "Energy transduction in oxygenic photosynthesis: an overview of structure and mechanism". In *Bioenergetics of photosynthesis*. Editor, Govindjee. New York : Academic Press, p. 319-371.
- Oxborough, K and N. R. Backer. 1997. "Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components-calculation of qP and F_v'/F_m without measuring F_o ". *Photosynth. Res.*, vol 54, p. 135-142.
- Pagliano, C., M. Raviolo, F. D. Vecchia, R. Gabbrielli, C. Gonnelli, N. Rascio, R. Barbato and N. La Rocca. 2006. "Evidence for PSII-donor side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.)". *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, vol. 84, p. 70-78.
- Pandey, V., V. Dixit and R. Shyam. 2005. "Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium". *Chemosphere*, vol. 61, p. 40-47.
- Pascal, J. and R. Popovic. 1993. Mécanismes de toxicité du dinitro-o-crésol dans les chloroplastes. *Water Pollut. Res. J. Canada*, vol. 28, p. 687-695.
- Pätsikkä, E., E. Aro and E. Tyystjarvi. 1998. "Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo". *Plant Physiol.*, vol. 117, p. 619-627.
- Pätsikkä, E., M. Kairavuo, F. Sersen, E. M. Aro and E. Tyystjarvi. 2002. "Excess copper predispose photosystem II to photoinhibition in vitro by out competing iron and causing decrease in leaf chlorophyll". *Plant Physiol.*, vol. 129, p. 1359-1367.
- Pawlisz, A. V., R. A. Kent, U. A. Schneider and C. Jefferson. 1997. "Canadian water quality guidelines for Cr". *Environ. Toxicol. Water Qual.* vol. 12, p. 185-193.
- Percival, M. P. and N. R. Baker. 1991. "Herbicides and photosynthesis". In *Herbicides*. Editors, M. P. Percival and N. R. Baker. Amsterdam: Elsevier, pp. 1-26.
- Peterson, M. M., G. L. Horst, P. J. Shea and S. D. Comfort. 1998. "Germination and seedling development of switchgrass and smooth brome grass exposed to 2,4,6-trinitrotoluene". *Environ. Pollut.*, vol. 99, p. 53-59.

- Pfundel, E. 1998. "Estimating the contribution of PSI to total leaf chlorophyll fluorescence". *Photosynth. Res.*, vol. 56, p. 185-195.
- Plekhanov, S. E. and Yu K. Chemeris. 2003. "Early toxic effects of zinc, cobalt and cadmium on photosynthetic activity of the green alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39". *Ecology*, vol. 30, p. 610-616.
- Popelkova, H., S. D. Betts, N. Lydakis-Symantiris, M. M. Im, E. Swenson and C. F. Yocum. 2006. "Mutagenesis of basic residues R151 and R161 in manganese-stabilizing protein of photosystem II causes inefficient binding of chloride to the oxygen evolving complex". *Biochemistry*, vol. 45, p. 3107-3115.
- Prasad, M. N. V. and K. J. Dietz. 1999. "Heavy metals stress in plants". In *Free radical and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity*. Editors, M. N. V. Prasad and J. Hagemeyer. Springer-Verlag, p. 73-97.
- Prasad, S. M., J. B. Singh, L. C. Rai and H. D. Kumar. 1991. "Metal-induced inhibition of photosynthetic electron transport chain of the cyanobacterium *Nostoc muscorum*". *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 82, p. 95-100.
- Rachid, A., E. L. Camm and A. K. M. Ekramoddoullah. 1994. "Molecular mechanism of action of Pb^{2+} and Zn^{2+} on water oxidizing complex of photosystem II". *FEBS Lett.*, vol. 350, p. 296-298.
- Raines, C. 2003. "The Calvin cycle revisited". *Photosynth. Res.*, vol. 75, p. 1-10.
- Ralph, P. J. and M. D. Burchett. 1998. "Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress". *Environ. Pollut.*, vol. 103, p. 91-101.
- Raven, P. H., R. F. Evert and S. E. Eichhorn. 2000. "Photosynthèse, lumière et vie". In *Biologie végétale*. Paris: De Boeck Université, pp. 126-152.
- Renger, G. 2001. "Photosynthetic water oxidation to molecular oxygen: apparatus and mechanism". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1503, p. 210-228.
- Robidoux, P. Y., G. Bardai, M. Sarrazin, L. Paquet, P. Gong, J. Hawari and G. I. Sunahara. 2000. "Ecotoxicological risk assessment of an antitank firing range contaminated with explosives". *Final Report*. Montreal: IRB, pp. 54.
- Rohacek, K. 2002. "Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships". *Photosynthetica*, vol. 40, p. 13-29.
- Rohacek, K. and M. Bartak. 1999. "Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications". *Photosynthetica*, vol. 37, p. 339-363.

- Rutherford, A. W. and L. Anja Krieger-Liszkay. 2001. "Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II". *Trends Biochem. Sci.*, vol. 26, p. 648-653.
- Schreiber, U., U. Schliwa and W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynth. Res.*, vol. 10, p. 51-62.
- Schreiber, U. 2004. "Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorimetry and saturation pulse method: An overview". In *Chlorophyll a fluorescence : a signature of photosynthesis*. Editors, G. C., Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht: Springer, pp. 279-319.
- Seidler, A. 1996. "The extrinsic polypeptides of photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1277, p. 35-60.
- Sersen, F. and K. Kralova. 2001. "New facts about CdCl_2 action on the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts and its comparison with HgCl_2 action". *Photosynthetica*, vol. 39, p. 575-580.
- Shanker, A. K., C. Cervantes, H. Loza-Tavera and S. Avudainayagam. 2005. "Chromium toxicity in plants". *Environ. Int.*, vol. 31, p. 739-753.
- Shimoni, E., O. Rav Hon, I. Ohad, V. Brumfeld and Z. Reich. 2005. "Three dimensional organization of higher-Plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography". *The Plant Cell*, vol. 17, p. 2580-2586.
- Shutova, T., J. Nikitina, G. Deikus, B. Andersson, V. Klimov and G. Samuelsson. 2005. "Structural dynamics of the manganese stabilizing protein-effect of pH, calcium and manganese". *Biochemistry*, vol. 44, p. 15182-15192.
- Sigfridsson, K. G. V., G. Bernat, F. Mamedov and S. Styring. 2004. "Molecular interference of Cd^{2+} with photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1659, p. 19-31.
- Singh, M., K. S. Reddy, V. P. Singh and T. R. Rupa. 2007. "Phosphorus availability to rice (*Oriza sativa* L.) wheat (*Triticum aestivum* L.) in a Vertisol after eight years of inorganic and organic fertilizer additions". *Bioresour. Technol.*, vol. 98, p. 1474-1481.
- Smeets, K., A. Cuypers, A. Lambrechts, B. Semane, P. Hoet, A. Van Laere and J. Vangronsveld. 2005. "Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application". *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 43, p. 437-444.
- Song, Y. G., B. Liu, L. F. Wang, M. H. Li and Y. Liu. 2006. "Damage to the oxygen evolving complex by superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical in photoinhibition of photosystem II". *Photosynth. Res.*, vol. 90, p. 67-78.
- Sprovieri, M., M. L. Feo, L. Prevedello, D. S. Manta, S. Sammartino, S. Tamburrino and E. Marsella. 2007. "Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated

- biphenyls in surface sediments of Naples harbour (southern Italy) ". *Chemosphere*, vol. 67, p. 998-1009.
- Sproviero, E. D., J. A. Gascon, J. P. McEvoy, G. W. Brudvig and V. S. Batista. 2007. "Quantum mechanics/molecular mechanics structural models of the oxygen-evolving complex of photosystem II". *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 17, p. 173-180.
- Srivastava, A., B. Guissé, H. Greppin and R. J. Strasser. 1997. "Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient : OKJIP". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1320, p. 95-106.
- Strasser, R. J. and Govindjee. 1991. "The Fo and O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae". In *Regulation of chloroplast biogenesis*. Editor, J. H. Argyroudi-Akoyunoglou. New York : Plenum Press. pp. 423-426.
- Strasser, B. J. and R. J. Strasser. 1995. "Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test". In *Photosynthesis: From light to Biosphere*. Editor, P. Mathis. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, vol. V, pp. 977-980.
- Strasser, R. J., A. Srivastava and Govindjee 1995. "Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria". *Photochem. Photobiol.*, vol. 61, p. 32-42.
- Strasser, R. J. 1997. "Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients". *Photosynth. Res.* vol. 52, p. 147-155.
- Strasser, B. J., H. Dau, H. Heinze and H. Senger. 1999. "Comparison of light induced and cell cycle dependent changes in the photosynthetic apparatus: a fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus*". *Photosynth. Res.*, vol. 60, p. 217-227.
- Strasser, B. J., A. Srivastava and M. Tsimilli-Michael. 2000. "The fluorescence transient as tool to characterize and screen photosynthetic samples". In *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*. Editors, M. Yunus, U. Pathre and P. Mohanty. London: Taylor and Francis, pp. 445-483
- Strasser, R. J. and A. D. Stirbet. 2001. "Estimation of the energetic connectivity of PSII centers in plants using the fluorescence rise O-J-I-P fitting of experimental data to three different PSII models". *Mathem. Comp. Simul.*, vol. 56, p. 451-461.
- Strasser, R.J., A. Srivastava and M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient". In *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration*. Editors, G. Papageorgiou and Govindjee. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, vol. 19, pp. 321-362.

- Stroch, M., V. Spunda and I. Kurasova. 2004. "Non-radiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants". *Photosynthetica*, vol. 42, p. 323-337.
- Suorsa, M. and E. M. Aro. 2007. "Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants". *Photosynth. Res. In press*.
- Susplugas, S., A. Srivastava and R. J. Strasser. 2000. "Changes in the photosynthetic activities during several stages of vegetative growth of *Spirodela polyrhiza* : Effect of chromate". *J. Plant Physiol.*, vol. 157, p. 503-512.
- Szabo, I., E. Bergantino and G. M. Giacometi. 2005. "Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation". *EMBO Report*, vol. 6, p. 629-634.
- Talmage, S. S., D. M. Opresko, C. J. Maxwell, C. J. E. Welsh, F. M. Cretella, P. H. Reno and F. B. Daniel. 1999. "Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values". *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 161, p. 1-156.
- Thompson, D. G., K. R. Solomon, B. F. Wojtaszek, A. N. Edginton and G. R. Stephenson. 2006. "The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities". *Appl. Ecol.*, vol. 16, p. 2022-2027.
- Thornber, J. P., D. T. Morishige, S. Anadan and G. F. Peter. 1991. "Chlorophyll-carotenoid proteins of higher plant thylakoids". In *Chlorophylls*. Editor, H. Scheer. Londres : CRC Press, p. 549-585.
- Van Kooten, O. and J. F. H. Snel. 1990. "The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology". *Photosynth. Res.*, vol. 25, p. 147-150.
- Vichnevetskaia, K. D. and D. N. Roy. 1999. "Oxidative stress and antioxidative defence with an emphasis on plants antioxidants". *Environ. Rev.*, vol. 7, p. 31-51.
- Vredenberg, W. J. 2000. "A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination". *Biophys. J.*, vol. 79, p. 26-38.
- Wade, M. J., B. K. Davis, J. S. Carlisle, A. K. Klein and L. M. Valoppi. 1993. "Environmental transformation of toxic metals". *Occup. Med.*, vol. 8, p. 575-601.
- Wahid, A. 2006. "Influence of atmospheric pollutants on agriculture in developing countries: a case study with three new wheat varieties in pakistan". *Sci. Total Environ.*, vol. 371, p. 304-313.
- Walker, D. A. 1981. "Secondary fluorescence kinetics of spinach leaves in relation to the onset of photosynthetic carbon assimilation". *Planta*, vol. 153, p. 273-278.

- Watanabe, T., K. Machida, H. Suzuki, M. Kobayashi and K. Honda. 1985. "Photoelectrochemistry of metallochlorophylls". *Coord. Chem. Rev.*, vol. 64, p. 207-224.
- White, A.J. and C. Critchley. 1999. "Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus". *Photosynth. Res.*, vol. 59, p. 63-72.
- Whitmarsh, J. and Govindjee. 1999. "The photosynthetic process". In *Concept in Photobiology Photosynthesis and Photomorphogenesis*. Editors, G. S. Singhal, G. Renger, S. K. Sopory, K. D. Irragang and Govindjee. New Delhi, India, Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, pp. 11-51.
- Whitmarsh, J. and Govindjee. 2002. "Photosystem II". In *Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 13. Nature Publishing Group, www.els.net.
- Wincencjusz, H., C. F. Yocum and H. J. Van Gorkom. 1999. "Activating anions that replace Cl⁻ in the O₂-evolving complex of photosystem II slow the kinetics of the terminal step in water oxidation and destabilize the S₂ and S₃ states". *Biochemistry*, vol. 38, p. 3719-3725.
- Wollman F. A. 2001. "State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus". *The EMBO J.*, vol. 20, p. 3623-3630.
- Yi, X., M. McChargue, S. Laborde, L. K. Frankel and T. M. Bricker. 2005. "The manganese-stabilizing protein is required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy in higher plants". *J. Biol. Chem.*, vol. 280, p. 16170-16174.
- Yruela, I., G. Gatzen, R. Picores and A. R. Holzwarth. 1996. "Cu (II) inhibitory effect on photosystem II from higher plants. A picosecond time-resolved fluorescence study". *Biochemistry*, vol. 35, p. 9469-9474.
- Zrýd, J. P., M. Lanoz, F. Rachidi and P. Zweijacker. 2002. "Influence of HF electromagnetic fields on the development and the molecular biology of the moss *Physcomitrella patens* and the nematode *Caenorhabditis elegans*". 14th International Symposium on Electromagnetic Compatibility. Zurich : Proceedings Supplement, , p. 179-180.